

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LA CHIMIOTHÉRAPIE ANTIENDOTOXIQUE

par C. LEVADITI et A. VAISMAN

en collaboration avec L. REINIÉ.

Deux faits nous ont conduits à supposer que les dérivés benzéniques sulfurés peuvent exercer *in vivo* une action neutralisante à l'égard de certaines endotoxines microbiennes. D'abord nos constatations (1) concernant la neutralisation exercée par les azoïques sulfamidés sur l'hémolysine et la leucocidine élaborées par les streptocoques pathogènes hémolytiques. Ensuite, les particularités de l'action curative des composés aromatiques à fonctions sulfamide, sulfone ou sulfoxyde dans la gonococcie expérimentale de la souris (2).

Il nous est, en effet, apparu que chez les souris inoculées par voie intrapéritonéale avec des gonocoques additionnés de mucine, et qui succombent entre dix-huit et quarante-huit

(1) LEVADITI et VAISMAN, *C. R. Soc. de Biol.*, **120**, 1935, p. 1077, confirmés par MEYER (*Quart. Bull. Sea View Hosp.*, **2**, 1937, p. 148). Tout récemment, GROOS, COOPER et LEWIS (*Proc. Soc. experim. Biol. and Med.*, **38**, 1938, p. 275) constatent que si l'action antihémolytique de la *p*-aminophénylsulfamide et du 4'-sulfamido-2-4-diaminazobenzène est faible, par contre celle du 4-sulfamidophényl-2-azo-7'-acétylamino-hydrozynahtalène-3'-6'-acide disulfonique (sel disodique) est nettement marquée.

(2) LEVADITI et VAISMAN, *La Presse Médicale*, n° 78, 1937, p. 1371; *C. R. Acad. des Sciences*, **205**, 1937, p. 1108.

heures, la mort est due soit à une péritonite accompagnée souvent de septicémie gonococcique, soit à une intoxication par les endotoxines du gonocoque. Dans ce dernier cas, la cavité péritonéale ne contient plus de germes, ceux-ci ayant subi une lyse totale avant la mort de l'animal (lyse intra- ou extraleucocytaire). Dans une série de 43 souris, par exemple, inoculées au même moment, 20 p. 100 des animaux peuvent appartenir à cette dernière catégorie.

Or, certains dérivés aromatiques sulfurés, tels, entre autres, le diaminodiphénylsulfone, le dioxydiphénylsulfone, le diaécétyldiaminodiphénylsulfoxyde, la *p*-aminophénylsulfamide, l'*Uliron* (*p*-aminobenzènesulfonylaminodiméthylsulfamide), et, surtout, le 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde (3), agissent curativement, peu importe si la mort des souris témoins est due à la péritonite gonococcique, ou à l'intoxication par les endotoxines du gonocoque. Il s'en suit que, dans ce cas particulier, *la chimiothérapie peut être simultanément antimicrobienne et antiendotoxique.*

Nous avons conclu de nos premières expériences (4), effectuées avec l'endotoxine gonococcique, que *l'activité thérapeutique in vivo de certains dérivés benzéniques sulfurés est non seulement antimicrobienne, mais encore antiendotoxique. « C'est la première fois que l'on démontrait ainsi la possibilité d'une chimiothérapie antitoxique, ce qui ouvrait des perspectives nouvelles sur le plan du traitement chimiothérapique des infections microbiennes toxigènes »* (Levaditi et Vaisman, 29 novembre 1937).

Etant donné l'exceptionnelle importance de ces premières constatations, nous avons estimé nécessaire d'étendre nos investigations à d'autres endotoxines, telles celles du *méningocoque*, du *b. d'Aertrycke*, des *bacilles dysentériques Flexner et Shiga*, de la *Pasteurella avicida*, à quelques toxines proprement dites (*exotoxines*), soit : les *toxines élaborées par le b. diphtérique*, le *vibrio septique*, le *B. histolyticus*, etc., et aussi au *venin de serpent*. Or, tous les essais entrepris avec les

(3) La plupart de ces dérivés ont été préparés par MM. Girard, Ray et Richard (cf. pour les composés aromatiques à fonction sulfoxyde : GIRARD, RAY et RICHARD, *Nature*, **140**, 1937, p. 283).

(4) LEVADITI et VAISMAN, *C. R. Acad. des Sciences*, **205**, 1937, p. 1108.

endotoxines sus-citées ont confirmé nos premiers résultats, en sorte que nos conclusions se sont révélées avoir une portée générale. De plus, nous nous sommes efforcés de préciser, autant que possible, le *mécanisme de cette activité antiendotoxique*. La plupart de nos expériences ont été relatées dans des notes présentées soit à l'*Académie des Sciences*, soit à la *Société de Biologie* ; on en trouvera la citation dans le présent Mémoire, dont le but est de démontrer :

1° *Qu'à côté de la sérothérapie antitoxique, il nous faudra, dorénavant, compter sur une chimiothérapie antiendotoxique;*

2° *Que dans le mécanisme présidant à l'activité curative de certains médicaments benzéniques sulfurés à l'égard d'infections microbiennes variées (gonocoque, méningocoque, pneumocoque, streptocoque), il y aura lieu d'ajouter au facteur antimicrobien proprement dit, un second facteur, celui-ci antiendotoxique.*

I. — Chimiothérapie antiendotoxique.

1° ENDOTOXINE DU GONOCOQUE.

Nous avons utilisé, dans des expériences analogues à celles qui nous ont servi pour nos recherches sur la chimiothérapie de l'infection gonococcique expérimentale de la souris, non pas des gonocoques vivants, mais des extraits de corps microbiens, préalablement dévitalisés. De tels extraits, préparés en congelant et décongelant des émulsions concentrées [40 tubes de culture de 22 millimètres (milieu = gélose + 10 p. 100 sérum-ascite de l'Institut Pasteur) dans 50 cent. cubes d'eau salée isotonique ; congélation pendant vingt-quatre heures], et en centrifugeant, ont été injectés à des souris par *voie intraveineuse*. Ils ont provoqué la mort de la plupart des animaux en moins de vingt heures, à la dose de 0 c. c. 5 et 0 c. c. 25, ou une maladie passagère à la dose de 0 c. c. 10. Un extrait semblable nous a servi à l'expérience chimiothérapique suivante :

EXPÉRIENCE. — Dose d'endotoxine administrée par voie intraveineuse = 0 c. c. 25 pour une souris de 20 grammes (5). Traitement par le 4-nitro-4'-aminodiphénylesulfoxyde [*corps 62*] (2 milligrammes *per os*).

Témoins (10). Dix-huit heures = 6 M + 4 V (6) ; vingt-quatre heures = 6 M + 4 V, mais *malades*. Ces dernières se remettent par la suite. *Survie définitive* = 4 V (40 p. 100).

Traitées (15). Dix-huit heures = 4 M + 11 V. *Survie définitive* = 11 V (73 p. 100).

Cette expérience mettait en évidence une certaine activité antiendotoxique du dérivé benzénique utilisé, mais ces résultats ne nous ont pas satisfaits. Aussi avons-nous eu recours, par la suite, à une *endotoxine desséchée*, préparée d'après la technique que voici :

TECHNIQUE. — Emulsions très concentrées de gonocoques (cultures âgées de un à cinq jours), isolement des corps microbiens par centrifugation, dessiccation de ces corps dans le vide sulfurique pendant vingt-quatre heures et reprise par de l'eau salée isotonique (7). Injection *intrapéritonéale*, à la dose de 3 milligrammes, 2 milligrammes, 1 milligr. 5 et 1 milligramme pour une souris de 20 grammes. Les animaux succombent (suivant la dose) entre dix-huit et quarante-huit heures, rarement plus tard (8).

Traitement simultané par le *corps 62* (3 milligrammes *per os*).

RÉSULTATS. — a) Dose d'endotoxine = 3 milligrammes.

Témoins (5). Vingt-quatre heures = 2 V + 3 M ; deuxième jour = 5 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

Traitées (10). Vingt-quatre heures = 5 V + 5 M ; deuxième jour = 3 V + 7 M. *Survie définitive* = 3 V (30 p. 100).

b) Dose d'endotoxine = 2 milligrammes. Traitement = 5 milligrammes *per os*.

Témoins (10). Vingt-quatre heures = 5 V + 5 M ; trente-six heures = 3 V + 7 M ; deuxième jour = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

Traitées (20). Vingt-quatre heures = 13 V + 7 M ; trente-six heures = 12 V + 8 M. *Survie définitive* = 12 V (60 p. 100).

(5) Il est toujours préférable d'utiliser, dans ces expériences, des souris jeunes, ne pesant pas plus de 16 à 18 grammes.

(6) M = morte ; V = vivante.

(7) Lorsqu'on soumet à la centrifugation (3.000 t/M) une telle suspension d'endotoxine, préalablement desséchée, on constate une répartition du pouvoir toxique entre le liquide surnageant et le précipité. Une partie de l'endotoxine est donc soluble.

(8) L'activité toxique varie suivant les différentes « venues » d'endotoxine, d'où la nécessité d'utiliser des souris témoins pour chaque expérience en cours.

c) Dose d'endotoxine = 1 milligr. 5. Même dose de médicament que précédemment.

Témoins (20). Vingt-quatre heures = 6 V + 14 M ; deuxième jour = 5 V + 15 M ; du cinquième au septième jour = 2 V + 18 M. *Survie définitive* = 2 V (10 p. 100).

Traitées (20). Vingt-quatre heures = 11 V + 9 M. *Survie définitive* = 11 V (55 p. 100).

Dans une expérience semblable aux précédentes, l'*azoïque sulfamidé I* (4'-sulfamido-2-4-diaminoazobenzène) (20 milligrammes *per os*) n'a pas semblé agir.

CONCLUSIONS. — Il résulte de l'ensemble de ces protocoles que le 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde exerce une action antiendotoxique *in vivo* à l'égard de l'endotoxine gonococcique, action pouvant se traduire par 60 p. 100 de survies.

2° ENDOTOXINE DU MÉNINGOCOQUE (9).

Même mode de préparation que celui utilisé pour l'endotoxine gonococcique. Les doses mortelles (injection intrapéritonéale) varient entre 3 et 5 milligrammes. Même procédé expérimental.

1° PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Dose d'endotoxine = 4 milligrammes.

a) *Souris témoins* (10). Dix-huit heures = 9 M + 1 V ; vingt-quatre heures = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

b) P-aminophénylsulfamide (10) (20 milligrammes *per os*). Dix-huit heures = 6 M + 4 V ; quarante-huit heures = 7 M + 3 V. *Survie définitive* = 3 V (30 p. 100).

c) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone (10) (10 milligrammes *per os*). Dix-huit heures = 6 M + 4 V ; quarante-huit heures = 7 M + 3 V. *Survie définitive* = 3 V (30 p. 100).

d) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde (10) (5 milligrammes *per os*). Dix-huit heures = 3 M + 7 V. *Survie définitive* = 7 V (70 p. 100).

2° DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Dose d'endotoxine = 4 milligrammes.

a) *Souris témoins* (10). Dix-huit heures = 7 M + 3 V ; vingt-quatre heures = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

b) P-aminophénylsulfamide (10). Dix-huit heures = 1 M + 9 V ; vingt-quatre heures = 7 M + 3 V ; quarante-huit heures = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

c) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone (10). Dix-huit heures = 5 M + 5 V ; vingt-quatre heures = 8 M + 2 V ; quarante-huit heures = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

d) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde (10). Dix-huit heures = 3 M + 7 V ; quarante-huit heures = 5 M + 5 V. *Survie définitive* = 5 V (50 p. 100).

CONCLUSIONS — Ces expériences montrent que *parmi les dérivés utilisés* [4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde, 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone (10) et *p*-aminophénylsulfamide], *le 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde se révèle capable d'empêcher in vivo l'intoxication provoquée chez la souris par l'endotoxine méningococcique* (pourcentage des survies = 50 à 70 p. 100). Si l'on compare à cette action celle des mêmes dérivés sur l'infection méningococcique chez la même espèce animale, on constate qu'il n'y a pas de concordance entre les deux activités thérapeutiques.

3° ENDOTOXINE DU BACILLE D'AERTRYCKE (11).

(En collaboration avec L. Reinié.)

Nous devons cette endotoxine à M. Boivin et M^{me} Mesrobeanu, que nous prions d'agréer nos remerciements. Elle a été préparée par ces expérimentateurs dans un état voisin de la pureté chimique, d'après leur méthode indiquée antérieurement (12) (acide trichloracétique). Même technique expérimentale que celle utilisée ci-dessus.

1° PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Dose d'endotoxine = 0 c. c. 0125 (0 milligr. 02 d'endotoxine desséchée).

a) *Témoins* (10). Dix-huit heures = 6 M + 4 V ; vingt-quatre heures = 6 M + 4 V ; quarante-huit heures = 7 M + 3 V. *Survie définitive* = 3 V (30 p. 100).

b) *P-aminophénylsulfamide* (10) (20 milligrammes *per os*). Dix-huit heures = 10 V ; vingt-quatre heures = 1 M + 9 V. *Survie définitive* = 9 V (90 p. 100).

c) *4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone* (10) (5 milligrammes *per os*). Dix-huit heures = 10 V ; vingt-quatre heures = 1 M + 9 V. *Survie définitive* = 9 V (90 p. 100).

d) *Dioxydiphénylsulfone* (10) (10 milligrammes *per os*). Dix-huit heures = 3 M + 7 V ; vingt-quatre heures = 3 M + 7 V. *Survie définitive* = 7 V (70 p. 100).

e) *4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde* (10) (5 milligrammes *per os*).

(10) Ce dérivé se rapproche de celui étudié par Buttle et Stephenson (*The Lancet*, 235, 1937, p. 1931) dans les streptococcies (diamino-diphénylsulfone).

(11) LEVADITI, VAISMAN et REINIÉ. *C. R. Soc. de Biol.*, 126, 1937, p. 1092.

(12) BOIVIN et MESROBEANU. *Revue d'Immunologie*, 4, 1935, p. 553; *ibid.*, 2, 1936, p. 113.

Dix-huit heures = 10 V ; vingt-quatre heures = 10 V. *Survie définitive* = 10 V (100 p. 100).

2° DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Dans cette expérience, l'endotoxine, de même que les médicaments, furent utilisés à deux reprises et à vingt-quatre heures d'intervalle. Les doses d'endotoxine ont été de 0 c. c. 03 et de 0 c. c. 15, celles de médicament les mêmes que dans l'expérience précédente.

a) *Témoins* (10). Dix-huit heures après la deuxième dose = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

b) P-aminophénylsulfamide (15). Dix-huit heures = 5 M + 10 V ; vingt-quatre heures = 5 M + 10 V. *Survie définitive* = 10 V (66 p. 100).

c) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone (15). Dix-huit heures = 1 M + 14 V ; vingt-quatre heures = 3 M + 12 V. *Survie définitive* = 12 V (80 p. 100).

d) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde (15). Dix-huit heures = 4 M + 11 V ; vingt-quatre heures = 5 M + 10 V. *Survie définitive* = 10 V (66 p. 100).

3° TROISIÈME EXPÉRIENCE. — Enfin, dans une dernière expérience, la dose d'endotoxine injectée en une seule fois fut de 0 c. c. 15 ; elle provoqua la mort de 14 témoins sur 15 en moins de dix-huit heures. Or, malgré cette intoxication massive d'emblée, l'action antiendotoxique, surtout d'un des deux composés utilisés, fut manifeste (corps 62).

a) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone (20). Dix-huit heures = 11 M + 9 V ; vingt-quatre heures = 16 M + 4 V ; quarante-huit heures = 0 V. *Survie définitive* = 0 p. 100 (retard dans la mortalité).

b) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde (20). Dix-huit heures = 6 M + 14 V ; vingt-quatre heures = 10 M + 10 V. *Survie définitive* = 8 V (40 p. 100).

Dans toutes ces expériences, l'activité antiendotoxique des dérivés utilisés s'est traduite non seulement par la survie indéfinie de certains animaux, mais encore par le fait que des souris nettement malades ont guéri par la suite.

CONCLUSIONS. — Certains dérivés benzéniques sulfurés exercent *in vivo* une action antiendotoxique manifeste à l'égard de l'endotoxine du bacille d'Aertrycke. Cette activité est d'autant plus accusée que la dose de cette endotoxine se rapproche de la dose maxima tolérée. Tous les dérivés utilisés se sont révélés agissants, mais, parmi eux, c'est le 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde qui a semblé le plus actif.

En outre, il nous est apparu qu'il n'y avait pas de rapport entre le pouvoir antiendotoxique des composés administrés et leur activité antimicrobienne *in vivo*, laquelle s'est révélée être des plus faibles à l'égard de la même souche de bacille

d'Aertrycke ayant servi à la préparation de l'endotoxine, ainsi qu'il ressort des protocoles suivants :

- EXPÉRIENCE. — 0 c. c. 3 de dilution de culture au 1/10, intrapéritonéal.
- Témoins (5). Vingt-quatre heures = 1 M + 4 V ; deuxième jour = 3 M + 2 V ; troisième jour = 5 M. *Survie définitive* = 0 V.
- a) P-aminophénylsulfamide (10) (20 milligrammes *per os*). Vingt-quatre heures = 1 M + 9 V ; deuxième jour = 5 M + 5 V ; troisième jour = 10 M + 0 V. *Survie définitive* = 0 V.
- b) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde (10). (5 milligrammes *per os*). Vingt-quatre heures = 3 M + 7 V ; deuxième jour = 7 M + 3 V ; troisième jour = 9 M + 1 V ; quatrième jour = 10 M + 0 V. *Survie définitive* = 0 V.
- c) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone (10) (10 milligrammes *per os*). Vingt-quatre heures = 6 M + 4 V ; deuxième jour = 9 M + 1 V ; troisième jour = 10 M + 0 V. *Survie définitive* = 0 V.

Un certain retard, surtout avec le 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde, a été constaté.

4° ENDOTOXINE DU BACILLE DYSENTÉRIQUE (13).

La même activité antiendotoxique peut être mise en évidence à l'égard des endotoxines des bacilles dysentériques Shiga et Flexner.

1° *Endotoxine du bacille dysentérique Shiga*. — Cette endotoxine a été isolée et purifiée chimiquement par M. Boivin et M^{me} Mesrobian. Dose : 0 c. c. 1 pour une souris de 20 grammes. Dérivés utilisés : 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde (62), 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone (70), p-aminophénylsulfamide et un azoïque sulfamidé, le sel sodique de l'acide 4'-sulfamidophénylazo-3-5-diaminobenzoïque.

RÉSULTATS. — a) *Témoins* (10). Quinze heures = 9 M + 1 V ; vingt-heures = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

b) 62. Dose = 5 milligrammes pour une souris de 20 grammes. 10 souris traitées. Quinze heures = 2 M + 8 V ; troisième jour = 3 M + 7 V. *Survie définitive* = 7 V (70 p. 100).

c) 70. Dose = 5 milligrammes. 10 souris traitées. Quinze heures = 4 M + 6 V ; vingt heures = 5 M + 5 V. *Survie définitive* = 5 V (50 p. 100).

d) P-aminophénylsulfamide. Dose = 30 milligrammes. 10 souris traitées. Quinze heures = 1 M + 9 V ; vingt heures = 3 M + 7 V ; vingt-

(13) LEVADITI et VAISMAN, C. R. Soc. de Biol., **128**, 1938, p. 463.

quatre heures = 4 M + 6 V; trente-six heures = 5 M + 5 V. *Survie définitive* = 5 V (50 p. 100).

e) *Azoïque*. Dose = 30 milligrammes. 10 souris traitées. Quinze heures = 6 M + 4 V; vingt heures = 7 M + 3 V; trente-six heures = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

CONCLUSIONS. — *Cette expérience montre que, parmi les dérivés utilisés, se sont révélés actifs, par ordre croissant de pouvoir antiendotoxique, le 70, la p-aminophénylsulfamide et le 62. L'efficacité de l'azoïque fut la moins marquée.*

2° *Endotoxine du bacille dysentérique Flexner*. — Même préparation. Dose = 0 c. c. 1 pour une souris de 20 grammes. Mêmes dérivés. Doses identiques.

RÉSULTATS. — a) *Témoins* (10). Dix-huit heures = 8 M + 2 V; vingt-quatre heures = 9 M + 1 V; trente-six heures = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

b) 62. 10 souris traitées. Dix-huit heures = 3 M + 7 V; vingt-quatre heures = 4 M + 6 V; troisième jour = 5 M + 5 V. *Survie définitive* = 5 V (50 p. 100).

c) 70. 10 souris traitées. Dix-huit heures = 4 M + 6 V; vingt-deux heures = 5 M + 5 V. *Survie définitive* = 5 V (50 p. 100).

d) *P-aminophénylsulfamide*. 10 souris traitées. Dix-huit heures = 2 M + 8 V; vingt-deux heures = 3 M + 7 V; trente-six heures = 5 M + 5 V; quarante heures = 6 M + 4 V. *Survie définitive* = 4 V (40 p. 100).

e) *Azoïque*. 10 souris traitées. Dix-huit heures = 5 M + 5 V; vingt-deux heures = 7 M + 3 V; troisième jour = 8 M + 2 V. *Survie définitive* = 2 V (20 p. 100).

CONCLUSIONS. — *A peu de chose près, résultats identiques aux précédents.*

Ajoutons qu'en plus des dérivés mentionnés ci-dessus, nous avons examiné le pouvoir antiendotoxique du corps 67 (4-nitro-4'-diphénylsulfure), à fonction sulfure, et aussi du 2-(p-aminophénylsulfamide)-pyridine, dont Whitby (14) a révélé récemment les propriétés curatives dans les infections pneumococciques. Les résultats ont été négatifs, témoin les protocoles suivants :

a) *Corps 67*. Dose = 30 milligrammes *per os*. *Endotoxine Flexner* (0 c. c. 10).

Témoins (3). Quinze heures = 3 M + 0 V (0 p. 100).

(14) WHITBY. *The Lancet*, 4, 1938, p. 1210. Ce corps a été préparé par M. Ewins et aimablement mis à notre disposition par M. Barral.

Traitées (10). Quinze heures = 5 M + 5 V ; vingt-quatre heures = 9 M + 1 V. *Survie définitive* = 1 V (10 p. 100).

b) 2-(p-aminophénylsulfamide)-pyridine. Dose = 30 milligrammes *per os*. *Endotoxine Flexner* (0 c. c. 10).

Témoins (6). Quinze heures = 4 M + 2 V ; vingt-quatre heures = 6 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

Traitées (10). Quinze heures = 10 M + 0 V. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

*
* *

L'action antiendotoxique à l'égard des endotoxines des bacilles dysentériques Flexner et Shiga, mise en lumière par les données mentionnées ci-dessus, est loin de se manifester d'une manière aussi nette lorsqu'on éprouve l'effet curatif des mêmes médicaments sur *l'infection provoquée chez la souris par les bacilles dysentériques eux-mêmes*. Afin d'augmenter la virulence de ces bacilles, nous avons additionné, à des cultures âgées de vingt-quatre heures, de la mucine (procédé employé dans la méningococcie et la gonococcie expérimentales). Les deux protocoles que voici rendent compte de ces différences :

EXPÉRIENCE. — 1° *Bacille dysentérique Shiga*. 0 c. c. 75 mucine + culture de vingt-quatre heures diluée au 1/10. 0 c. c. 3 intrapéritonéal.

Témoins (10). Dix-huit heures = 7 M (15) + 3 V ; quatrième jour = 8 M + 2 V. *Survie définitive* = 2 V (20 p. 100).

a) P-aminophénylsulfamide (10). Dose = 30 milligrammes *per os*. Dix-huit heures = 5 M + 5 V ; vingt-deux heures = 7 M + 3 V ; deuxième jour = 9 M + 1 V ; troisième jour = 10 M + 0 V. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

b) *Corps 62* (10). Dose = 5 milligrammes *per os*. Dix-huit heures = 5 M + 5 V ; deuxième jour = 7 M + 3 V ; troisième jour = 9 M + 1 V ; quatrième jour = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

c) *Corps 70* (10). Dose = 5 milligrammes *per os*. Dix-huit heures = 4 M + 6 V ; vingt-deux heures = 6 M + 4 V ; deuxième jour = 8 M + 2 V ; quatrième jour = 9 M + 1 V. *Survie définitive* = 1 V (10 p. 100).

2° *Bacille dysentérique Flexner*. Les résultats sont comparables aux précédents, quoique tant soit peu meilleurs et en faveur de la p-aminophénylsulfamide (3 survies définitives sur 10 souris traitées).

CONCLUSIONS. — *Alors que certains dérivés benzéniques sul-*

(15) Chez toutes les souris mortes, excepté la dernière, l'exsudat péritonéal contenait un grand nombre de bacilles et de leucocytes.

furés neutralisent in vivo les endotoxines des bacilles dysentériques Flexner et Shiga (injectées à des doses adéquates), par contre, leur effet thérapeutique dans l'infection expérimentale provoquée chez la souris par les mêmes bacilles (additionnés de mucine) apparaît des plus faibles. Il est probable que la quantité d'endotoxine élaborée par ces microbes dans l'organisme dépasse celle que les susdits composés sont capable de neutraliser chez les animaux qui reçoivent l'endotoxine pure. Au surplus, au facteur « INFECTION », vient s'ajouter ici un second facteur « TOXIQUE », pour fournir une explication plausible à ces discordances (16).

5° ENDOTOXINE DE LA *Pasteurella avicida*.

Il a été prouvé [Levaditi et Reinié (17)] que des composés aromatiques sulfurés, tels la *p*-aminophénysulfamide, le 4-nitro-4'-aminodiphénysulfone et le 4'-sulfamido-2-4-diaminoazobenzène, administrés *per os* à des souris blanches, déterminent la guérison d'un certain nombre de ces souris si, simultanément, on infecte les animaux, par voie intrapéritonéale, avec une culture éminemment virulente de *Pasteurella avicida*. L'effet curatif est, certes, moins marqué que celui obtenu avec les mêmes composés dans les infections streptococciques expérimentales, mais, dans le cas de la *Pasteurella avicida*, il s'agit de germes dont l'activité pathogène pour la souris dépasse sensiblement celle du streptocoque. Or, on enregistre des résultats analogues lorsque, au lieu de se servir de microbes vivants, on s'adresse aux endotoxines élaborées par la même *Pasteurella*. En voici la preuve :

TECHNIQUE. — Identique à celle nous ayant servi à la préparation de l'endotoxine du gonocoque et du méningocoque (cultures préalablement chauffées à 60°). L'endotoxine de la *Pasteurella avicida*, injectée à la souris, par voie intracélomique, à la dose de 5 à 10 milligrammes pour une souris de 20 grammes, tue l'animal par intoxication (cultures négatives) en douze à vingt heures. On administre à une série de souris 5 milligrammes d'endotoxine dans le péritoine et, au même moment, on leur fait ingérer le médicament aux doses adéquates. D'autres ani-

(16) Ces conclusions sont valables pour les endotoxines du méningocoque et du bacille d'Aertrycke.

(17) LEVADITI et REINIÉ, *C. R. Soc. de Biol.*, **127**, 1938, p. 1179.

maux servent de témoins. Nos essais ont été effectués avec la *p*-aminophénylsulfamide, l'acide 4'-sulfamidophénylazo-3-5-diaminobenzène (sel sodique) (Az. IV) et le 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde (62).

RÉSULTATS. — Plusieurs essais ont été effectués. En voici un à titre d'exemple :

a) *Souris témoins* (10). Quinze heures = 7 M + 3 V; trente-six heures = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

b) *Azoïque IV* (10). Dose = 30 milligrammes. Quinze heures = 4 M + 6 V; trente-six heures = 9 M + 1 V. *Survie définitive* = 1 V (10 p. 100).

c) *Corps 62* (10). Dose = 5 milligrammes. Quinze heures = 7 M + 3 V; trente-six heures = 8 M + 2 V. *Survie définitive* = 2 V (20 p. 100).

d) *P-aminophénylsulfamide*. Dose = 30 milligrammes. Quinze heures = 2 M + 8 V; trente-six heures = 3 M + 7 V. *Survie définitive* = 7 V (70 p. 100).

Le nombre des survies définitives a varié d'une expérience à l'autre (*p-aminophénylsulfamide*). Ainsi, dans un autre essai [dose d'endotoxine = 2 milligrammes (18)], 5 sur 8 souris survécurent indéfiniment (62 p. 100); le chiffre des survivances fut de 7 sur 16 (43 p. 100) dans un troisième essai (dose d'endotoxine = 5 milligrammes).

L'action antiendotoxique de la *p*-aminophénylsulfamide est donc incontestable, alors que celle de l'azoïque IV et du 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde est nulle ou faible.

CONCLUSIONS. — La *p-aminophénylsulfamide* se révèle douée de propriétés antiendotoxiques in vivo à l'égard de l'endotoxine élaborée par la *Pasteurella avicida*.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

L'ensemble de ces données expérimentales montre péremptoirement que certains dérivés benzéniques sulfurés, à fonction sulfamide, sulfone ou sulfoxyde, exercent in vivo une action antiendotoxique manifeste à l'égard des endotoxines élaborées par le gonocoque, le méningocoque, le bacille d'Aertrycke, les bacilles dysentériques Flexner et Shiga et la *Pasteurella avicida*. Sans qu'il y ait une relation constante entre la constitution chimique du dérivé actif et l'optimum de ses propriétés neutralisantes pour tel ou tel de ces principes toxiques, il apparaît, cependant, que parmi les composés étudiés, ce sont la *p*-aminophénylsulfamide, le 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone

(18) A cette dose, la mort des souris témoins survient du deuxième au quatrième jour.

et, surtout, le 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde qui se révèlent les plus actifs et aussi les plus polyvalents. Il en résulte, également, qu'il n'y a pas toujours concordance entre l'activité antiendotoxique de ces composés et leur efficacité anti-infectieuse.

Ces conclusions préliminaires demandent à être complétées, en ce qui concerne :

1° L'ACTION ANTITOXIQUE PROPREMENT DITE (EXOTOXINES) des mêmes dérivés aromatiques sulfurés ;

2° LE MÉCANISME DE L'ACTIVITÉ ANTIENDOTOXIQUE.

Examinons ces deux problèmes.

II. — Activité antitoxique et antivenimeuse.

Nous avons étudié l'influence de la plupart des dérivés énumérés précédemment sur l'intoxication provoquée, chez la souris, par les toxines staphylococcique et diphtérique, les toxines du vibrion septique et du *B. histolyticus*, la toxine dysentérique et le venin de serpent.

1° TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE. — Cette toxine nous a été aimablement procurée par M. Ramon. Elle détermine la mort de la souris en moins de vingt-quatre heures, après injection intrapéritonéale de 0 c. c. 05, 0 c. c. 08 ou 0 c. c. 1. Les expériences, dont nous nous dispensons de donner les protocoles, ont montré qu'à l'égard de ces deux dernières doses, les composés sus-décrits n'exercent aucune action curative manifeste (dérivés 62, 70, *p*-aminosulf. et azoïque I).

2° TOXINE DIPHTÉRIQUE. — Aucun effet appréciable chez la souris (dose de toxine injectée par voie intrapéritonéale = 0 c. c. 25 ; mort des animaux en deux à sept jours ; dérivés 62, 70, *p*-aminosulf. et azoïque I).

3° TOXINES DES GERMES ANAÉROBIES (19). — *a*) *Vibrion septique*. Dose = 0 milligr. 1 (intraveineux).

(19) Ces toxines ont été mises à notre disposition par le service de M. Weinberg, que nous prions d'agréer nos remerciements.

a) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde. Dose = 5 milligrammes *per os*.
Témoins (6). Vingt-quatre heures = 1 M + 5 V; trente-six heures = 2 + 4 V; quarante-huit heures = 3 M + 3 V; troisième jour = 4 M + 2 V. *Survie définitive* = 2 V.

Traitées (6). Dix-huit heures = 2 M + 4 V; vingt-quatre heures = 3 M + 3 V; trente-six heures = 4 M + 2 V. *Survie définitive* = 2 V.

b) 4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone. Dose = 5 milligrammes.

Témoins (les mêmes).

Traitées (6). Dix-huit heures = 1 M + 5 V; vingt-quatre heures = 3 M + 3 V; trente-six heures = 5 M + 1 V; quatrième jour = 6 M. *Survie définitive* = 0 V.

CONCLUSIONS. — *Aucune action antitoxique manifeste*. Cependant, dans d'autres essais, nous avons constaté un faible effet antitoxique de la *p*-aminophénylsulfamide.

β *B. histolyticus*. Dose de toxine = 0 milligr. 10; voie intraveineuse.

Témoins (6). Dix-huit heures = 5 M + 1 V; quarante-huit heures = 6 M + 0 V. *Survie définitive* = 0 V.

a) *Corps 62*. Dose = 5 milligrammes. Dix-huit heures = 5 M + 1 V; trente-six heures = 6 M + 0 V. *Survie définitive* = 0 V.

b) *Corps 70* (mêmes témoins, même dose) (6). Dix-huit heures = 5 M + 1 V; vingt-quatre heures = 6 M + 0 V. *Survie définitive* = 0 V.

CONCLUSION. — *Aucune action antitoxique manifeste*.

4° VENIN DE NAJA. — Dose de venin administrée par voie intrapéritonéale à la souris = 0 milligr. 025. Aucun effet antivenimeux des dérivés 62, 70, *p*-aminosulf. et azoïque IV.

5° TOXINE DYSENTÉRIQUE (20). — Dose de toxine injectée à la souris par voie intrapéritonéale = 0 c. c. 75. Aucun effet antitoxique des dérivés 62, 70, *p*-aminosulf. et azoïque IV.

CONCLUSIONS. — *Ainsi, quelle que soit l'exotoxine à laquelle nous nous sommes adressés, il nous fut impossible, dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés, de constater in vivo un effet antitoxique comparable à celui enregistré à l'égard des ENDOTOXINES*. Excepté la *p*-aminophénylsulfamide (qui s'est révélée faiblement active à l'égard de la toxine du vibron septique), aucun des dérivés étudiés n'a

(20) Cette toxine a été mise à notre disposition par M. Dumas, que nous prions d'agréer nos remerciements.

empêché l'intoxication des souris de manière que nous soyons autorisés à leur attribuer des propriétés antiexotoxiques évidentes.

Il semble donc résulter de ces données expérimentales que *les susdits dérivés benzéniques sulfurés désintoxiquent in vivo principalement les endotoxines, c'est-à-dire des complexes protéiniques ou glucido-lipidiques faisant partie intégrante du corps microbien, et non pas (ou, tout au moins, pas au même degré) les toxines sécrétées par le germe pathogène (exotoxines).*

Il nous faudra donc entreprendre de nouvelles recherches, dans des voies différentes et avec des composés chimiques autres que ceux utilisés jusqu'à présent, pour découvrir les éléments d'une véritable chimiothérapie antitoxique. C'est ce que nous nous proposons de faire.

III. — Mécanisme de l'activité antiendotoxique.

Nous avons entrepris un certain nombre d'expériences dans le but de préciser le mécanisme de l'activité antiendotoxique des dérivés aromatiques sulfurés, sans cependant réussir, jusqu'à présent, à résoudre le problème d'une manière entièrement satisfaisante. Nous croyons, cependant, avoir fait avancer suffisamment la question pour que l'exposé de nos recherches puisse servir de base à des investigations futures.

Afin de nous rapprocher, autant que possible, de la connaissance des facteurs qui interviennent dans ce processus de désintoxication chimique, nous avons estimé utile d'étudier *quelques particularités concernant le comportement des endotoxines in vivo et in vitro, les suites immunitaires chez les animaux guéris chimiothérapiquement, la durée de l'effet préventif antiendotoxique, les rapports entre les voies d'introduction de l'endotoxine, d'une part, celles du médicament, d'autre part, le pouvoir neutralisant in vitro, et, enfin, le rôle des oxydo-réductions dans la chimiothérapie antiendotoxique.* Examinons ces questions.

1° QUELQUES PROPRIÉTÉS DES ENDOTOXINES.
LA CHIMIO-PRÉVENTION.

Nous avons vu, dans ce qui précède, que l'endotoxine gonococcique (poudre obtenue par congélation des corps microbiens et dessiccation dans le vide sulfurique), soumise à la centrifugation à 3.000 t/m, révèle une répartition du principe toxique entre le liquide surnageant et le dépôt (voir p. 638, note 7). Or, dans une expérience préliminaire, faite en collaboration avec M. Païc, l'endotoxine Flexner (type Boivin et Mesrobian) a été ultracentrifugée à 83.000 t/m (centrifuge d'Henriot et Huguenard), pendant une heure. L'examen du liquide surnageant et du dépôt (repris par le même volume d'eau salée) a montré que, sous l'influence des grands champs de gravitation, les molécules d'endotoxine n'ont pas abandonné complètement le milieu pour se déposer au fond de la cupule. En effet, ce liquide, injecté à la dose de 0 c. c. 10 (péritoine), a tué 4 souris en dix-huit à quarante-huit heures, et le culot de centrifugation a provoqué la mort de 4 souris, dans le même espace de temps (sur 6 animaux).

Il résulte de ces constatations : 1° que l'endotoxine gonococcique est partiellement soluble dans l'eau physiologique, et, 2° que le volume des molécules d'endotoxine glucido-lipidique (Flexner) est inférieur à celui des molécules qui seraient déposées intégralement par une ultracentrifugation pendant une heure à 83.000 t/m.

Par ailleurs, nous avons étudié, d'une part, l'action hémolytique et leucocidique de l'endotoxine Flexner, et, d'autre part, les lésions qu'elle peut provoquer chez les souris.

En ce qui concerne le premier point, aucune activité, ni hémolytique (hématies de mouton à 5 p. 100), ni leucocidique (globules blancs de cobaye), n'a été remarquée (doses variant entre 1/100.000 et 1/10). Pour ce qui a trait au second point, d'assez nombreuses souris mortes à la suite d'intoxications provoquées par les diverses endotoxines étudiées (et, tout particulièrement, celles du gonocoque et des bacilles dysentériques), ont été examinées histologiquement. Or, nous avons constaté de l'hyperhémie, de petites hémorragies cérébrales, hépatiques,

pulmonaires, rénales ou surrénales, des fragmentations nucléaires des leucocytes spléniques, suivies de phagocytose de leur chromatine par les macrophages, et nullement des altérations dégénératives ou nécrotiques des éléments nobles, quels qu'ils soient, altérations pouvant être mises sur le compte de l'activité nocive de l'endotoxine. Le poison paraît donc s'attaquer principalement au système vasculaire dans son ensemble, sans localisation préférentielle dans un tissu quelconque.

Quant aux *voies d'accès*, nous confirmons Boivin et Mesrobianu en ce qui concerne le fait que l'endotoxine glucido-lipidique agit parfaitement et à des doses infinitésimales, lorsqu'elle est administrée par voie *intrapéritonéale* ou *intraveineuse*, mais nous avons été surpris de constater son innocuité *quasi* totale, lorsqu'elle est injectée par voie intracérébrale. Le protocole suivant en fournit la preuve :

EXPÉRIENCE. — Deux souris reçoivent, par voie transcranienne, 0 c. c. 05 endotoxine Flexner. Elles survivent. Huit jours après, inoculation intrapéritonéale de 0 c. c. 10 de la même toxine. Les animaux succombent après vingt-quatre heures.

Deux autres souris sont inoculées avec 0 c. c. 05 de la même toxine diluée au 1/5 (= 0 c. c. 01). Elles survivent, mais se révèlent réceptives lors d'une injection intrapéritonéale de 0 c. c. 10.

EXPÉRIENCE. — Six souris sont inoculées, par voie transcranienne, avec 0 c. c. 05 d'endotoxine Flexner, en même temps que deux autres souris reçoivent, par voie intrapéritonéale, 0 c. c. 10 de la même toxine. Ces dernières succombent en quinze et dix-huit heures, alors que quatre parmi les premières survivent indéfiniment.

Il en résulte que, tout au moins pour ce qui a trait aux endotoxines des bacilles dysentériques purifiées chimiquement, le poison agit rapidement, provoquant une intoxication massive, très probablement par suite d'une action sur le système vasculaire considéré dans son ensemble, et cela peu importe si sa voie de pénétration est le péritoine, ou la circulation sanguine. La voie intracérébrale apparaît comme la moins favorable (21).

C'est donc sur un principe toxique agissant rapidement que le médicament antiendotoxique exerce son influence neutralisante dans l'organisme vivant. Il s'en suit que cette influence doit, elle-même, se manifester avec rapidité, et que,

(21) D'autres voies de pénétration sont à l'étude.

très probablement, elle ne saurait persister au delà d'une certaine limite, particulièrement restreinte. C'est ce que l'expérience confirme pleinement.

EXPÉRIENCE. — Deux séries de 40 souris reçoivent, la première, 30 milligrammes de *p*-aminodiphénylsulfamide, la seconde 5 milligrammes de 4-nitro-4'-aminophénylsulfoxyde *per os*. Puis, *simultanément*, 6, 10, et 24 heures après, ces animaux, de même que 10 souris témoins, sont inoculés, par voie intrapéritonéale, avec 0 c. c. 10 d'endotoxine Flexner. Voici les résultats enregistrés :

Témoins (10). Dix-huit heures = 6 M + 4 V; deuxième jour = 9 M + 1 V. *Survie définitive* = 1 V. (10 p. 100).

1° *P*-aminophénylsulfamide. a) *Simultanément* (10). Quinze heures = 1 M + 9 V; deuxième jour = 2 M + 8 V. *Survie définitive* = 8 V (80 p. 100).

b) *Après six heures* (10). Quinze heures = 1 M + 9 V; dix-huit heures = 2 M + 8 V; *Survie définitive* = 8 V (80 p. 100).

c) *Après dix heures* (10). Quinze heures = 3 M + 7 V; dix-huit heures = 4 M + 6 V; deux jours = 5 M + 5 V. *Survie définitive* = 5 V (50 p. 100).

d) *Après vingt-quatre heures* (10). Quinze heures = 7 M + 3 V; dix-huit heures = 9 M + 1 V; vingt-deux heures = 10 M. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

2° Corps 62. a) *Simultanément* (10). Dix-huit heures = 2 M + 8 V; deuxième jour = 3 M + 7 V. *Survie définitive* = 7 V (70 p. 100).

b) *Après six heures* (10). Dix-huit heures = 4 M + 6 V. *Survie définitive* = 6 V (60 p. 100).

c) *Après dix heures* (10). Quinze heures = 3 M + 7 V; deuxième jour = 4 M + 6 V. *Survie définitive* = 6 V (60 p. 100).

d) *Après vingt-quatre heures* (10). Quinze heures = 7 M + 3 V; dix-huit heures = 7 M + 3 V; deuxième jour = 9 M + 1 V. *Survie définitive* = 1 V (10 p. 100).

CONCLUSIONS. — *Il résulte de cette expérience (où l'activité de la p-aminophénylsulfamide s'est révélée supérieure à celle du corps 62), que la résistance conférée par ces médicaments aux souris intoxiquées par l'endotoxine Flexner, s'épuise rapidement. Cet épuisement débute vers la dixième heure succédant à l'administration du composé per os, et apparaît presque total à la vingt-quatrième heure (22).*

(22) *Il est plus que probable que l'activité antiendotoxique du médicament cesse dès que, par son groupement toxigène, l'endotoxine s'est fixée sur les tissus réceptifs.*

2° RAPIDITÉ DE LA NEUTRALISATION *in vivo*
DE LA FONCTION TOXIGÈNE DES ENDOTOXINES.

C'est donc dans les quelques heures qui succèdent à l'introduction dans l'organisme de l'endotoxine, d'une part, du dérivé antiendotoxique, d'autre part, que le conflit s'engage entre ces deux facteurs opposés l'un à l'autre, conflit aboutissant, très vraisemblablement, à la neutralisation, ou à la destruction de la fonction toxigène de l'endotoxine.

L'organisme assiste-t-il indifférent à ce conflit, ou bien y participe-t-il pour venir en aide à la défense antiendotoxique ?

Nous ne le pensons pas, pour la simple raison que nous rencontrons dans le domaine de la chimiothérapie antiendotoxique, le même phénomène de « l'absolu » qui caractérise la chimiothérapie antimicrobienne. Nous avons insisté maintes fois sur ce fait (découvert, en premier, par Domagk), à savoir que, toutes choses étant égales (race et poids des souris, doses du médicament, espèce et variété microbienne), un certain nombre d'animaux succombent à l'infection, quelques-uns résistent temporairement, alors que (dans un pourcentage variable selon l'efficacité de l'agent thérapeutique), d'autres survivent indéfiniment. C'est cette constatation qui, dès le début, fut invoquée en faveur de l'intervention de la résistance propre de l'organisme dans le processus de la guérison médicamenteuse des infections bactériennes. Or, il en est de même sur le plan de la chimiothérapie antiendotoxique, d'où il s'en suit que d'un côté comme de l'autre, l'intervention de cet organisme dans le conflit paraît hors de doute. Un autre fait est tout aussi certain : c'est qu'en dépit du traitement, l'animal subit, pendant un certain temps, l'influence nocive de l'endotoxine, attendu que dès le début il paraît malade, abattu, quasi parésié, en sorte que l'on assiste non pas à une prévention totale d'emblée, mais plutôt à une *guérison médicamenteuse d'un processus toxique incipient*.

Que devient la *fonction antigénique* de la molécule d'endotoxine ? Quoiqu'il nous soit, tout au moins pour l'instant, impossible de l'affirmer, nous pensons que cette fonction antigénique subit le même sort que la fonction toxigène. En effet,

il ressort de nos protocoles (dont l'exposé détaillé nous semble superflu), que toutes les souris ayant, grâce au traitement médicamenteux, échappé à l'intoxication, se sont révélées réceptives à une seconde injection de la même endotoxine, pratiquée quelques jours après (22 bis). Il en fut ainsi des endotoxines du gonocoque, du méningocoque, du bacille d'Aertrycke, des bacilles dysentériques Flexner et Shiga ; seule l'endotoxine de la *Pasteurella avicida* a paru faire exception à cette règle.

3° RAPPORTS ENTRE LES VOIES D'INTRODUCTION DU MÉDICAMENT ET DE L'ENDOTOXINE.

Dans la plupart de nos essais, nous avons administré le médicament antiendotoxique par la voie digestive et l'endotoxine par la voie intrapéritonéale. Ces conditions sont-elles indispensables, pour que l'effet antiendotoxique puisse se manifester ? Afin de résoudre ce problème, nous avons réalisé les expériences que voici :

1° Administration du médicament sous la peau, injection de l'endotoxine dans la cavité péritonéale (23).

EXPÉRIENCE. — Nous nous sommes servis de deux endotoxines, celle du gonocoque et celle du bacille dysentérique Flexner (Boivin et M^{me} Mesrobianu); comme médicament, nous avons utilisé le 4-nitro-4'-aminodiphénysulfoxyde (62) (dose 5 milligrammes).

a) Endotoxine gonococcique. Dose = 2 milligrammes.

Témoins (4). Quinze heures = 2 M + 2 V ; vingt-quatre heures = 4 M. Survie définitive = 0 V (0 p. 100).

Traitées (12). Quinze heures = 1 M + 11 V ; troisième jour = 2 M + 10 V ; cinquième jour = 3 M + 9 V. Survie définitive = 9 V (60 p. 100). Un second essai a fourni des résultats identiques aux précédents.

b) Endotoxine du bacille dysentérique Flexner. Dose = 0 c. c. 10.

Témoins (4). Vingt heures = 4 M + 0 V. Survie définitive = 0 V (0 p. 100).

Traitées (12). Vingt heures = 4 M + 8 V. Survie définitive = 8 V (66 p. 100).

L'administration du médicament par voie digestive n'est donc pas indispensable, attendu que l'on enregistre les mêmes effets, si ce médicament (62) est injecté sous la peau.

(22 bis) Même si l'on répète le traitement.

(23) LEVADITI et VAISMAN, C. R. Soc. de Biol., 128, 1938, p. 873.

2° *Administration du médicament par voie digestive et injection de l'endotoxine par voie intraveineuse (24).*

Il importait de savoir si, en introduisant l'endotoxine directement dans la circulation sanguine, l'effet curatif serait le même, attendu que la voie intraveineuse est celle qui assure une résorption, pour ainsi dire, instantanée et massive du produit toxique. Voici les résultats fournis par l'expérience :

TECHNIQUE. — *Endotoxine du bacille dysentérique Flexner*. Injection dans la veine caudale de la souris (dose = 0 c. c. 10). Les dérivés ont été administrés *per os* peu de temps avant cette injection, aux doses indiquées ci-dessous.

RÉSULTATS. — 1° *Première expérience.*

a) *Témoins* (6 souris). Quinze heures = 4 M + 2 V; vingt-quatre heures = 5 M + 1 V. *Survie définitive* = 1 V (16 p. 100).

b) *Acide 4-sulfamidophénylazo-3-5-benzoïque* (sel sodique). Dose = 30 milligrammes. 9 souris. Quinze heures = 2 M + 7 V; vingt heures = 4 M + 5 V; vingt-six heures = 5 M + 4 V; deuxième jour = 6 M + 3 V. *Survie définitive* = 3 V (33 p. 100).

c) *P-aminophénylsulfamide*. Dose = 30 milligrammes. 10 souris. Quinze heures = 2 M + 8 V; vingt heures = 3 M + 7 V; vingt-quatre heures = 4 M + 6 V; deuxième jour = 5 M + 5 V. *Survie définitive* = 5 V (50 p. 100).

d) *4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone*. Dose : 5 milligrammes 10 souris. Vingt-quatre heures = 1 M + 9 V; deuxième jour = 3 M + 7 V. *Survie définitive* = 7 V (77 p. 100).

e) *4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde*. Dose = 5 milligrammes. 9 souris. Quinze heures = 1 M + 8 V; deuxième jour = 2 M + 7 V. *Survie définitive* = 7 V (77 p. 100).

2° *Deuxième expérience. Mêmes doses.*

a) *Témoins* (14 souris). Dix-huit heures = 12 M + 2 V; vingt-quatre heures = 13 M + 1 V. *Survie définitive* = 1 V (7 p. 100).

b) *P-aminophénylsulfamide*. 15 souris. Dix-huit heures = 6 M + 9 V, deuxième jour = 7 M + 8 V. *Survie définitive* = 8 V (53 p. 100).

c) *4-nitro-4'-aminodiphénylsulfone*. 15 souris. Dix-huit heures = 6 M + 9 V; deuxième jour = 7 M + 8 V. *Survie définitive* = 8 V (53 p. 100).

d) *4-nitro-4'-aminodiphénylsulfoxyde*. 12 souris. Dix-huit heures = 4 M + 8 V; troisième jour = 5 M + 7 V. *Survie définitive* = 7 V (58 p. 100).

CONCLUSIONS. — Il résulte de l'ensemble de ces essais que l'activité antiendotoxique de certains dérivés benzéniques sulfurés à fonction sulfamide, sulfone ou sulfoxyde à l'égard de

l'endotoxine du bacille dysentérique Flexner, se manifeste même si l'endotoxine est injectée à la souris par voie intraveineuse. En conséquence, une résorption rapide et massive de cette endotoxine ne diminue pas sensiblement l'efficacité antiendotoxique de ces dérivés. LA DESTRUCTION DE LA FONCTION TOXIGÈNE DOIT DONC S'OPÉRER TRÈS RAPIDEMENT DANS L'ORGANISME.

4° ACTIVITÉ ANTIENDOTOXIQUE *in vitro*.

En présence des résultats expérimentaux obtenus grâce à l'utilisation de la chimiothérapie antiendotoxique, la première idée qui vient à l'esprit est que *l'effet curatif serait dû à une action neutralisante, que les dérivés efficaces exerceraient directement sur la fonction toxigène de l'endotoxine.* On raisonne ici comme lorsqu'il s'est agi d'expliquer l'activité thérapeutique des mêmes dérivés à l'égard des *infections provoquées par des microbes pathogènes.* Or, on sait, à l'heure actuelle, que la conception suivant laquelle cette activité se réduirait, en dernière analyse, à un phénomène de *bactériostatique* directe, est en contradiction avec certaines données expérimentales, et qu'elle n'a qu'une valeur relative (25).

TABLEAU I (1).

DOSE INJECTÉE dans le péritoine	ENDOTOXINE + 62	ENDOTOXINE TÉMOIN
0 c.c. 15	Souris 1 } Souris 2 } + 15 h. Souris 3 }	Souris 13 } Souris 14 } + 15 h. Souris 15 }
0 c.c. 10	Souris 4 } Souris 5 } + 15 h. Souris 6 }	Souris 16 } Souris 17 } + 15 h. Souris 18 } M et + 20 h.
0 c.c. 05	Souris 7 } Souris 8 } + 15 h. Souris 9 }	Souris 19 } Souris 20 } + 20 h. Souris 21 } M, puis G.
0 c.c. 01	Souris 10 } + 15 h. Souris 11 } M, puis G. Souris 12 }	Souris 22 } + 15 h. Souris 23 } + 20 h. Souris 24 } M, puis G.
(1) +, morte; M, malade; G, guérie.		

(25) V. à ce sujet, notre mémoire qui paraîtra dans un prochain numéro de ces *Annales*.

Que faut-il penser d'une semblable hypothèse, considérée sur le plan de la chimiothérapie antiendotoxique ?

Nous avons recherché si certains composés, s'étant révélés le plus agissants *in vivo*, étaient capables d'annihiler *in vitro* la fonction toxique de l'endotoxine. Nous nous sommes adressés, pour cela, à l'endotoxine du bacille d'Aertrycke et à celle du bacille dysentérique Shiga. Voici les protocoles de nos expériences (Cf. tableaux I et II) :

1° *Endotoxine du bacille d'Aertrycke* (type Boivin et M^{me} Mesrobeanu). A 2 cent. cubes d'endotoxine, on ajoute 0 gr. 20 de 4-nitro-4'-aminodiphénysulfoxyde (62). Séjour à 37° pendant deux heures. Injection dans la cavité péritonéale de la souris.

2° *Endotoxine du bacille dysentérique Shiga* (même type). A 0 c. c. 20 d'endotoxine, on ajoute des quantités variables du dérivé 62 ou de p-aminophénysulfamide. Séjour pendant deux heures à 37°. Injection dans la cavité péritonéale de la souris.

Témoins (3). Quinze heures = 1 M + 2 V; vingt-quatre heures = 3 M. Survie définitive = 0 V (0 p. 100).

TABLEAU II.

CORPS UTILISÉ	DOSES DE DÉRIVÉ				
	0 milligr. 5	1 milligramme	2 milligrammes	3 milligrammes	5 milligrammes
62.	Souris 1 } Souris 2 } + 15 h. Souris 3 } + 24 h.	Souris 4 } Souris 5 } + 15 h. Souris 6 } + 15 h.	Souris 7 } Souris 8 } + 15 h. Souris 9 } + 15 h.	Souris 10 } Souris 11 } + 15 h. Souris 12 } + 24 h.	
p-aminophénysulfamide .		Souris 13 } Souris 14 } + 15 h. Souris 15 } + 15 h.			Souris 16 } Souris 17 } + 15 h. Souris 18 } + 15 h.

CONCLUSIONS. — Dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés, ni le 4-nitro-4'-aminodiphénysulfoxyde, ni la p-aminophénysulfamide ne se sont révélés capables de supprimer *in vitro* l'activité toxigène des endotoxines du bacille d'Aertrycke et du bacille dysentérique Shiga (26).

De plus, il résulte d'autres essais que le même résultat

(26) Résultats identiques avec l'endotoxine du bacille dysentérique Flexner.

négalif est enregistré, si l'on ajoute à l'endotoxine, dans le tube à essai, du 62 additionné soit de *foie de souris*, soit de *sérum de lapins* ayant reçu, au préalable, le même 62, ou la *p-aminophénylsulfamide*, et cela peu importe si l'on s'adresse à l'endotoxine du bacille d'Aertrycke, ou à celle du bacille dysentérique Flexner.

*
* *

De telles conclusions nous conduisent à penser que les *dérivés benzéniques sulfurés* jouissant de propriétés *chimiothérapiques antiendotoxiques* n'agissent pas tels quels dans l'*organisme vivant*, pour annihiler la fonction toxigène de l'endotoxine, mais indirectement, après avoir subi, dans le même organisme, des modifications plus ou moins profondes de leur constitution chimique. Nous arrivons, de la sorte, petit à petit, à notre conception actuelle concernant le mécanisme de la chimiothérapie antiinfectieuse proprement dite, à savoir que ni les azoïques sulfamidés, ni les composés aromatiques à fonction sulfamide, sulfone ou sulfoxyde, n'assurent la stérilisation microbienne *in vivo* à l'état où on les administre, mais seulement après s'être transformés en un principe véritablement actif (*principe X*), dont la nature est loin d'être précisée à l'heure actuelle. Nous ne sommes donc pas loin d'admettre que le même principe intervient également dans le processus antiendotoxique, en sorte que, *effet antibactérien et effet antiendotoxique* s'associent, pour converger vers le même but, soit la mise hors portée des armes agressives de l'agent pathogène.

*
* *

Reste à savoir de quelle manière ce principe actif réalise *in vivo* la neutralisation de la fonction toxigène de l'endotoxine. Nous entrons ici dans le domaine de la pure hypothèse, nos investigations ne nous ayant pas permis de résoudre d'une manière satisfaisante cet important problème. Nous sommes, cependant, enclins à supposer que, vraisemblablement, des phénomènes d'oxydo-réduction pourraient jouer un rôle effectif dans la désintoxication chimiothérapique de certains groupements fonctionnels toxigènes de la molécule protéinique, ou

glucido-lipidique des endotoxines. Ce sont des recherches expérimentales récentes, faites en collaboration avec A. Girard (27), qui nous ont conduits à concevoir cette hypothèse de travail.

En effet, le faible pouvoir bactériostatique des composés aromatiques sulfurisés, connus pour leur haute activité curative dans les infections microbiennes, ont conduit Levaditi, Girard et Vaisman à admettre que ces corps n'agissaient qu'après un certain nombre de transformations chimiques, s'effectuant soit dans l'organisme animal, soit (ce qui est moins probable) dans le corps microbien lui-même. Considérant que les groupements fonctionnels nécessaires à l'activité thérapeutique sont toujours situés en position *para*, les auteurs ont été amenés à envisager l'hypothèse (28) d'une oxydation aboutissant à une transformation quinoïde de la molécule, analogue à celle que subit la tyrosine dans sa dégradation *in vivo*. On connaît, par ailleurs, des composés aromatiques sulfurés à structure quinoïde (sulfoquinones).

Par extension de cette hypothèse, nous avons étudié le pouvoir curatif de quelques substances non sulfurées, ayant, comme caractère commun, de pouvoir subir, par voie d'oxydation, la modification quinoïde. Ces substances, azoïques ou non, ont été : hydroquinone (137), chlorhydrate de paraminophénol (141), diacétylhydroquinone (142), dibenzoate d'hydroquinone (144), 4-4'-dioxydiphénylamine (145), sulfate de benzidine (146), 4-4'-diaminodiphénylstilbène (148), 4-amino-4'-oxyazobenzène (150), 4-4'-diaminoazobenzène (151), Aurine (152), 4-4'-dioxyazobenzène (153), 4-4'-dioxystilbène (154), 4-4'-dioxydiphényle (155). Leur numéro d'ordre correspond à la date de leur examen au laboratoire.

Ces recherches ont permis de formuler les conclusions suivantes :

1° Certains dérivés benzéniques non soufrés, en particulier l'hydroquinone, son dérivé acétylé et le 4-4'-dioxyazobenzène, agissent curativement dans la toxi-infection gonococcique et méningococcique expérimentale :

2° A quelques exceptions près, l'hypothèse d'après laquelle

(27) LEVADITI, GIRARD et VAISMAN, *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, p. 305.

(28) Cette hypothèse a été imaginée par A. Girard.

une telle activité thérapeutique pourrait être due à la transformation des composés thérapeutiquement actifs en dérivés à structure quinonique, n'est pas en contradiction avec les résultats expérimentaux résumés ci-dessus.

*
* *

Or, il apparaît également que certains, parmi ces composés aromatiques non sulfurés sont également doués de propriétés antiendotoxiques. Tel est le cas de l'*hydroquinone* et de son dérivé acétylé qui, à l'égard de l'*endotoxine gonococcique* (2 milligrammes), peut réaliser une survie de 37 p. 100. Et il en est de même, quoique à un moindre degré, de la *quinone*, témoin le protocole suivant :

EXPÉRIENCE. — Endotoxine gonococcique = 2 milligrammes; voie intrapéritonéale. Quinone *per os*, dose = 2 milligrammes.

Témoins (4). Dix-huit heures = 2 M + 2 V; trente-six heures = 3 M + 1 V; quarante-huit heures = 4 M + 0 V. *Survie définitive* = 0 V (0 p. 100).

Traités (12). Quinze heures = 4 M + 8 V; dix-huit heures = 6 M + 6 V; trente-six heures = 8 M + 4 V. *Survie définitive* = 4 V (33 p. 100) (28 bis).

Il se peut donc qu'à la suite de leur transformation quinone dans l'organisme, les dérivés benzéniques sulfurés assurent, par voie d'oxydo-réduction, la destruction des groupements fonctionnels toxigènes des endotoxines protéiniques, ou glucido-protéiniques microbiennes (29). Il se peut, également, que certains organes oxydo-réducteurs, et en particulier le foie, interviennent dans ce processus de désintoxication chimiothérapique. Il se peut, enfin, qu'en dernière analyse, le mécanisme de cette désintoxication ne soit pas très

(28 bis) Nous continuons ces recherches avec d'autres endotoxines.

(29) Conformément aux constatations antérieures de Boivin et M^{me} Mesrobianu, ni le *permanganate de potasse* (de 1/10 à 1 milligramme) (*in vitro* et *in vivo*), seul ou en présence d'une émulsion de foie de souris, ni l'*eau oxygénée* (0 c. c. 5 à 10, 5 ou 2 volumes) (*in vitro* et *in vivo*) n'agissent, le premier sur l'*endotoxine Shiga*, la seconde sur l'*endotoxine Flexner*. Mais qui peut affirmer que les phénomènes d'oxydo-réduction s'effectuant dans l'organisme vivant, sont identiques à ceux que certains oxydants ou réducteurs peuvent réaliser dans le tube à essai ?

éloigné de celui dont l'organisme lui-même se sert pour rendre inoffensives les *doses sous-toxiques* des endotoxines microbiennes. Mais ce ne sont là que des possibilités, ou plutôt des hypothèses de travail ; seule une expérimentation systématique pourra nous fournir la clef du problème, particulièrement intéressant, de la chimiothérapie antiendotoxique.

RECHERCHES SUR LES CARACTÈRES BIOLOGIQUES DU BACILLE TUBERCULEUX AVIAIRE

par A. SAENZ.

(Institut Pasteur, laboratoire de recherches sur la tuberculose.)

La nature de la tuberculose des oiseaux parut définitivement établie le jour où Robert Koch, en 1882 [1], mit en évidence dans les organes d'un coq tuberculeux le bacille auquel son nom reste attaché. Ce bacille présentait les mêmes particularités tinctoriales et morphologiques que celui originaire des lésions tuberculeuses de l'homme ou du bœuf. Aussi tout d'abord, Koch, en se basant uniquement sur l'identité d'aspect et des réactions de coloration de ce bacille, considéra que le bacille de la tuberculose aviaire était le même que celui de la tuberculose des mammifères, et ce point de vue fut pendant quelques années unanimement admis.

En 1887, Nocard et Roux [2], grâce à l'heureux progrès réalisé dans la culture par l'addition de la glycérine, isolèrent une souche de bacille aviaire, sur gélose glycélinée, à partir des organes d'un faisan atteint de tuberculose spontanée, et ils furent alors à même d'apprécier les caractères de culture particuliers à ce germe.

Mais en réalité, c'est à Rivolta [3], en 1889, que revient le mérite d'avoir établi les différences qui séparent la tuberculose aviaire de celle des mammifères ; c'est lui qui montra que les produits tuberculeux de la poule sont incapables de produire une tuberculose généralisée chez le cobaye. Et c'est lui qui, le premier, se basant sur l'impossibilité de communiquer la tuberculose des mammifères aux oiseaux, émit l'hypothèse que la tuberculose des mammifères et celle des oiseaux étaient dues à deux espèces différentes.

Reprenant cette étude, Maffucci [4], en 1890, s'efforça de les distinguer en étudiant les conditions de leur développement.

En fait, il confirme les recherches de Rivolta en montrant que les poules succombent toujours de tuberculose généralisée, quand on leur inocule par n'importe quelle voie des organes de poules tuberculeuses.

Les importantes recherches de Rivolta et de Maffucci venaient donc mettre en question l'unicité de l'agent étiologique de la tuberculose, chez les diverses espèces d'animaux, comme l'avait posée R. Koch. Entre temps, ce dernier avait eu l'occasion d'examiner les caractères de diverses cultures d'origine aviaire, en particulier sur gélose glycinée, que lui avaient envoyées Nocard et d'autres auteurs ou qu'il avait obtenues lui-même par ensemencement direct d'organes de plusieurs poules tuberculeuses ; il constata alors que ces cultures avaient toutes le même aspect et en même temps confirma les particularités décrites par les auteurs précédents. Il combla ainsi les lacunes de ses premières recherches et écrivit, à l'occasion du Congrès de Berlin [5], en 1890 : « Je n'hésite pas à considérer les bacilles de la tuberculose des poules comme une espèce à part, quoique très rapprochée des vrais bacilles de la tuberculose. »

Il appartient ensuite à Straus et Gamaleia [6], en 1891, de préciser définitivement les caractères distinctifs qui séparent les bacilles aviaires de ceux des mammifères et à cette époque, ils concluent comme Koch « à deux espèces de bacilles tout à fait différentes »

Puis les recherches de Cadiot, Gilbert et Roger, de 1890 à 1898 [7], de Weber et Bofinger [8], en 1904, de M. Koch et L. Rabinowitsch [9], en 1907, aboutirent à la notion d'un bacille des oiseaux qui serait « une espèce beaucoup plus différente du genre *Mycobacterium* » que ne diffèrent entre eux les types de bacilles tuberculeux humain et bovin.

Ce mémoire a pour but de résumer les recherches que nous avons commencées il y a déjà plusieurs années. Nous ne limiterons pas notre travail exclusivement à la révision du problème de la variabilité, point que nous avons traité dans un mémoire précédent [10], et nous étudierons divers faits d'ordre expérimental qui, bien que déjà signalés en partie, n'ont pas jusqu'à présent suffisamment attiré l'attention des expérimentateurs.

Dans nos recherches, nous avons étudié au total 53 souches de bacilles aviaires dont l'origine ainsi que le mode d'isolement furent les suivants :

Ensemencement direct de la moelle osseuse de poules provenant des Halles Centrales de Paris	12
Ensemencement après traitement du foie de poules provenant des Halles Centrales de Paris	4
Ensemencement après traitement de la rate de poules provenant des Halles Centrales de Paris	27
Souches entretenues depuis des années dans nos laboratoires .	40

TECHNIQUES D'ISOLEMENT.

A. ENSEMENCEMENT DIRECT. LA « MYÉLOCULTURE ». — Etant donné la constance de l'infection de la moelle osseuse que nous avons enregistrée au cours de la tuberculose chronique de la poule, cette méthode d'isolement très simple et sûre, s'avère d'une réelle utilité, surtout lorsqu'il s'agit de poser le diagnostic à distance. En effet, il est très facile de sectionner l'un des os longs de l'animal et de l'envoyer par la poste au laboratoire aux fins de diagnostic.

Voici en quoi consiste la technique complète :

Après avoir dénudé le fémur des muscles correspondants, on sectionne transversalement l'épiphyse et au moyen d'un cautère effilé rougi à blanc, on cautérise l'orifice du canal médullaire sur une profondeur d'environ 10 millimètres. Puis, avec une pipette stérile de gros calibre, on aspire la moelle osseuse qu'on ensemence directement (myéloculture), par étalement sur plusieurs tubes de milieux solides, en particulier milieu à l'œuf ou pomme de terre glycécinée.

Nous avons appliqué en 1932, avec Manseau [14], cette technique à 43 poules tuberculeuses, provenant des Halles Centrales de Paris, et qui présentaient des lésions hépatiques et spléniques caractéristiques.

En nous servant du milieu à l'œuf-glycérine-asparagine-vert malachite, nous avons obtenu 12 résultats positifs. Les dates extrêmes d'apparition des colonies furent neuf et quatorze jours. L'échec enregistré concernait une vieille poule dont la moelle était ossifiée et qui d'ailleurs ne contenait pas de bacilles à l'examen direct.

B. PRODUITS INFECTÉS SECONDAIREMENT. — Les 31 autres souches ont été isolées de la rate ou du foie de poules, en appliquant notre technique à l'acide sulfurique [12] avec neutralisation par la soude, en présence de teinture de tournesol.

1 gramme de fragment d'organe est broyé stérilement dans un mortier, puis laissé au contact de 1 cent. cube d'acide sulfurique à 10 p. 100 (1), pendant vingt à trente minutes. Pour cette opération, on peut se passer du sable qui générerait certaines manipulations ultérieures comme la recherche directe du bacille dans le produit broyé. On introduit quelques gouttes de teinture de tournesol et on neutralise à l'aide de soude à 30 p. 100. On ensemente ensuite, en ne dépassant pas la quantité de 0 c. c. 5 par tube, à la surface de plusieurs tubes de milieu à l'œuf-glycérine-asparagine-vert malachite, qui est, comme nous le verrons plus loin, le plus favorable à la culture du bacille aviaire. Le délai d'apparition fut sensiblement le même qu'avec les produitsensemencés directement, signalés plus haut.

SENSIBILITÉ COMPARÉE DES DIVERS MILIEUX POUR LA CULTURE DU BACILLE AVIAIRE.

On sait, depuis le travail classique de Straus et Gamaleia (1891) pour différencier le bacille humain du bacille aviaire, que ce dernier peut se développer, après ensemencement direct de la rate de poules tuberculeuses, sur les milieux gélosés simples, glycinés ou sucrés.

Nous avons ensemencé, après traitement par l'acide sulfurique, des fragments de foie ou de rate de 14 poules tuberculeuses, sur les milieux suivants : milieu de Loewenstein différent de la formule originale de cet auteur en ce sens qu'il n'était glyciné (2) qu'à 2,5 p. 100 [13], milieu à l'œuf non glyciné, pomme de terre glycinée, gélose simple, gélose glycinée, gélose glucosée selon la formule de Sabouraud, sérum coagulé de cheval simple ou glyciné à 3 p. 100.

Dans trois cas, nous nous sommes limité à comparer le milieu à l'œuf avec la pomme de terre glycinée.

Le délai d'apparition des colonies fut assez variable suivant

(1) Quand l'infection secondaire révélée par frottis s'avère très intense, on traite le produit par l'acide sulfurique à 15 p. 100, comme nous l'avons fait dans 6 cas, soit le tiers de nos isoléments.

(2) Ce taux de glycérine s'est en effet montré le plus favorable pour la culture du bacille aviaire comme pour les bacilles des mammifères.

le milieu employé. D'après la rapidité d'apparition et l'abondance de la culture obtenue, le milieu de Loewenstein vient en première place (colonies apparues entre neuf et quatorze jours), suivi par la pomme de terre glycinée, la gélose glycinée, le sérum et la gélose Sabouraud, enfin la gélose simple où les colonies n'apparurent que très tardivement, au bout de soixante et même soixante-trois jours.

Le détail de cette expérience est donné dans le tableau I.

TABLEAU I.

NUMERO des souches	NOMBRE DE COLONIES						
	Loewenstein	Loewenstein sans glycérine	Pomme de terre	Gélose simple	Gélose glycinée	Gélose glucosée	Sérum
Poule 18.	8 8		++				
Poule 20.	8 8	++++	++++				
Poule 21.	++++	++++	0				
Poule 16.	8 8 ++		8	++	0	++++	
Poule 17.	8 8		8	10	++	++++	
Poule 23.	++++	++++	Infecté.	0	++	0	
Poule 24.	++++	++	0	+	++	6	++++
Poule 25.	8 8	0	++	+	+	0	0
Poule 26.	8 8	8	++++	+	++	0	0
Poule 27.	8 8	++++	++++	++++	++++	++	++++
Poule 28.	8 8	++++	++++	0	++++	++	0
Poule 29.	++++	++++	++++	20	++		++++
Poule 30.	++++	++++	++++	++	++	+	++++
Poule 31.	++++	+	++++				

∞, innombrables; +++++, nombreuses; ++, en petit nombre; +, rares.

La lecture de ce tableau montre que le milieu le plus sensible pour la culture du bacille aviaire est celui de Loewenstein; 14ensemencements ont fourni 14 cultures; viennent ensuite le milieu à l'œuf non glyciné (un échec), la pomme de terre glycinée (deux échecs), la gélose glycinée, la gélose simple (deux échecs sur 11ensemencements); enfin la gélose glucosée et le sérum coagulé qui sont les milieux les moins sensibles.

Ces observations confirment en général celles de Straus et Gamaleia sur la valeur nutritive de la gélose simple, glycinée ou sucrée. A l'époque, on ne connaissait pas encore la

valeur des milieux à l'œuf, ni celle de la pomme de terre sur laquelle Straus devait cependant remarquer, en 1896 [14], la croissance « facile et abondante » du bacille aviaire.

Il découle de ces expériences que, sans aucun doute, c'est le milieu à l'œuf glycérimé qu'il convient d'employer pour l'isolement toutes les fois qu'on a quelques raisons de penser à une contamination par le bacille aviaire.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

Il n'est pas douteux que c'est à Metchnikoff [15] que l'on doit d'avoir attiré l'attention le premier, en 1888, sur le polymorphisme que présente le bacille aviaire dans les milieux de culture. En effet, à cette époque où les divers types de bacilles n'avaient pas encore été différenciés, Metchnikoff signala la présence de formes filamenteuses, ramifiées et en massue, dans une culture sûrement d'origine aviaire puisqu'elle avait été obtenue à la température de 43°, température à laquelle, on le sait, les bacilles des mammifères ne se développent pas.

Nocard et Roux, dans leur remarquable mémoire sur le bacille aviaire, paru la même année, firent des constatations identiques.

En ce qui nous concerne, nous avons pu confirmer le bien-fondé de ces observations. D'une manière générale, les caractères morphologiques des bacilles aviaires, issus de cultures jeunes sur milieu de Loewenstein n'offrent rien de particulier. Les bacilles se présentent isolés ou en amas, plus courts cependant que les bacilles des mammifères (formes naines de Straus). Mais cet aspect est nettement différent quand il s'agit de germes provenant de vieilles cultures sur milieux pauvres (gélose glycérimée), ou obtenues à haute température ou encore de colonies secondaires apparues après plusieurs mois de séjour à la température du laboratoire. Nos constatations sur ce point sont les suivantes :

Les bacilles, de dimensions fort variables pour chaque souche (3), se présentent avec un pléomorphisme et un polymor-

(3) Van Deinse et M^{lle} Hooghiemster [16] ont décrit des souches dont les dimensions bacillaires oscillaient entre 2 et 10 μ .

phisme des plus accentués. Ils montrent un fort pourcentage de formes non acido-résistantes, formes coccoïdes ou bacillaires, ramifiées ou en chaînettes, formes filamenteuses et surtout, fait frappant, formes terminées par des renflements en forme de massue simulant l'aspect d'une spore terminale. Cet aspect est particulier aux bacilles issus de cultures, car nous ne l'avons rencontré que très rarement dans les frottis d'organes d'animaux atteints de tuberculose spontanée ou expérimentale ; c'est dans le pus d'ostéo-arthrites du lapin que nous l'avons observé.

Nous considérons ce caractère de polymorphisme comme particulièrement intéressant. Il peut présenter une certaine valeur diagnostique pour établir l'origine aviaire d'une souche donnée, car nous ne l'avons jamais remarqué jusqu'à présent dans les frottis de cultures ou d'organes d'animaux infectés avec des souches humaines ou bovines.

INFECTION EXPÉRIMENTALE DES POULES, PAR VOIE BUCCALE.

Le tube digestif étant la principale voie d'infection dans la tuberculose aviaire, nombre d'auteurs ont prétendu qu'il serait facile de contaminer les oiseaux en se servant de cette voie comme mode d'infection. C'est ainsi, par exemple, que Weber et Bofinger ont réussi à infecter 17 poules sur 21. Plus tard, L. Rabinowitsch [47] est arrivée au même résultat en se servant d'excréments de poules tuberculeuses ; mais en lisant les mémoires de ces auteurs, on constate qu'ils se sont servis de doses infectantes considérables telles qu'un tube entier de culture sur gélose, par animal.

Cependant, dans des expériences récentes telles que celles de Beller, de 1931 à 1933 [48], on insiste sur la nécessité d'ingestions massives et répétées pour réussir à reproduire la tuberculose aviaire chez la poule. Bornstedt et Rohrer [49], en 1932, font les mêmes remarques.

Etant donné ces incertitudes, nous avons repris la question. Voici les deux séries d'expériences que nous avons entreprises sur la poule, en nous servant soit de cultures, soit d'organes de poules tuberculeuses :

PREMIÈRE SÉRIE. — Nous nous sommes toujours servis de poulettes de deux à trois mois, afin d'écarter, dans la mesure du possible, le danger de la tuberculose spontanée. De plus, les animaux choisis étaient laissés à jeun les vingt-quatre heures qui précédaient l'infection. Le repas infectant se composait de mie de pain humectée avec une émulsion de bacilles en eau distillée stérile. Les germes employés dans cette première série d'expériences provenaient de cultures sur pomme de terre glycinée, qui étaient soit des souches aviaires dissociées d'aspect R, soit des souches récemment isolées d'aspect S typique.

Les doses qui furent données aux poules de cette façon varièrent entre 10 et 40 centigrammes. Dans certains cas, on répéta le repas infectant deux ou trois fois, à vingt-quatre heures d'intervalle.

Au total, 19 poules absorbèrent des bacilles aviaires provenant de 7 souches différentes. Elles moururent ou furent sacrifiées entre quarante-deux jours (2 poules) et neuf mois ; 9 d'entre elles présentèrent des lésions tuberculeuses, lésions toujours présentes sur l'intestin et fréquentes sur le foie et la rate. Aucune trace de tuberculose ne fut visible avant le quatrième mois.

DEUXIÈME SÉRIE. — Dans cette seconde série de recherches, nous avons infecté les poules par ingestion de fragments d'organes provenant de poules tuberculeuses. Dans ce but, des fragments de foie de la taille d'une noix furent broyés, mélangés à de la mie de pain, puis donnés à ingérer, en une ou deux fois, à 9 poules. 8 d'entre elles, mortes ou sacrifiées entre deux et sept mois et demi, présentèrent des lésions, lésions localisées à l'intestin ou généralisées au foie et à la rate.

Il est particulièrement intéressant de comparer les résultats donnés par la souche n° 16, qui servit à infecter des poules, soit directement à l'état de cultures pures, soit indirectement sous la forme du foie d'une poule infectée expérimentalement.

Dans le premier cas, des 4 poules mortes ou sacrifiées respectivement au bout de deux mois, deux mois et demi et sept mois (deux), une seule, morte au bout de sept mois, est trouvée tuberculeuse.

Dans le second cas, les 3 animaux infectés sont morts après quatre mois (deux) et sept mois et demi, tous avec des lésions plus ou moins généralisées.

L'ensemble de ces expériences est rapporté dans le tableau II.

On peut tirer de cet exposé les conclusions suivantes :

Tout d'abord, un long délai de temps est nécessaire pour obtenir la mort par tuberculose généralisée des poules infectées avec des cultures ou avec des organes d'animaux tuberculeux, en moyenne quatre à sept mois. Cependant, il faut remarquer que 3 poules infectées avec une souche lisse S, non dissociée,

récemment isolée, moururent, entre quatre et six mois, avec des lésions de tuberculose généralisée.

Secondement, les cultures se sont montrées moins virulentes que les organes : 9 poules contaminées sur 19, dans le premier

TABLEAU II.

SOUCHES	DÔSE en centigrammes	SURVIE	AUTOPSIE
<i>Ingestion de cultures à des poules :</i>			
Poule 1 R. .	10	7 mois 1/2.	Nodules sur intestin.
	10	7 mois 1/2.	Nodules sur intestin.
Poule 9 S. .	20	4 mois.	Nodules sur intestin, foie, rate, pylore.
	20	5 mois.	Nodules sur intestin, foie, rate.
	20	6 mois.	Nodules sur intestin, foie, rate.
Poule 10 R. .	20	4 mois.	Nodules sur foie, rate, intestin.
	20	40 jours.	Indemne.
Poule 11 R. .	10	7 mois.	Indemne.
	10	9 mois.	Indemne.
Poule 14 R. .	20	2 mois 1/2.	Indemne.
	20	4 mois.	Lésions sur foie, rate, intestin.
O. N. . . .	10	5 mois.	Indemne.
	10	3 mois.	Indemne.
	10	7 mois.	Lésions sur foie, rate, intestin.
Poule 16 S. .	20	2 mois.	Indemne.
	20	2 mois.	Indemne.
	20	7 mois.	Indemne.
	20	7 mois.	Lésions sur intestin, foie, rate.
<i>Ingestion d'organes de poules tuberculeuses :</i>			
Poule 16 S. .		4 mois.	Lésions sur foie, rate, reins.
		4 mois.	Trois granulations sur rate.
		7 mois 1/2.	Lésions osseuses et sur péritoine, intestin, foie, rate, cœur, gésier, ovaires, muscle de la cuisse.
Poule 17 S. .		2 mois.	Lésions intestinales.
		2 mois.	Lésions sur intestin, foie, rate.
		3 mois.	Lésions sur intestin, foie, rate.
		6 mois.	Quelques granulations sur rate.
		6 mois.	Indemne.

cas ; 8 sur 9 dans le second cas. De plus, le délai minimum de tuberculisation, de deux mois avec les organes, atteint quatre mois avec les cultures.

DEGRÉ DE VIRULENCE DES SOUCHES AVIAIRES RÉCEMMENT ISOLÉES
ET FORMES ANATOMO-CLINIQUES DE LA TUBERCULOSE EXPÉRI-
MENTALE PROVOQUÉE PAR VOIE VEINEUSE, CHEZ LA POULE ET
LE LAPIN.

Nous avons étudié 20 souches récemment isolées des organes de poules qui provenaient des Halles Centrales de Paris, en vue de déterminer leur virulence moyenne [20], ainsi que les localisations le plus fréquemment observées chez la poule et le lapin inoculés par voie veineuse.

Pour le titrage de la virulence de nos 20 souches, chez la poule et le lapin, nous avons utilisé les cultures des premiers passages sur pomme de terre glycinée, âgées de vingt à trente jours, qui avaient l'aspect typique, gras, brillant, humide, lisse et uni des souches aviaires au moment de l'isolement.

Nos émulsions ont été préparées avec des bacilles pesés à l'état frais, non essorés et, dans la plupart des cas, nous avons pris soin de changer de pipette entre chaque dilution.

A. POULE. — A titre d'exemples, nous avons relevé les résultats obtenus chez la poule avec plusieurs souches aviaires — en excluant ceux donnés par des doses massives de germes — dans le tableau n° 3.

Forme aiguë. — L'inoculation intraveineuse de doses massives, 1, 5 et 10 milligrammes chez la poule, se traduit par un syndrome semblable en certains points au syndrome type Yersin chez le lapin, caractérisé par l'amaigrissement et la cachexie rapide des animaux qui meurent entre quatorze jours et trois semaines. A l'autopsie, on trouve une énorme hypertrophie de la rate et du foie (poids moyen du foie et de la rate, 137 grammes et 7 grammes au lieu de 45 grammes et 1 gr. 5, poids normal chez la poule), avec absence de lésions nodulaires mais présence fréquente de fines granulations visibles seulement à la loupe. Les frottis du foie, de la rate et de la moelle osseuse contiennent des bacilles acido-résistants en abondance.

Forme subaiguë. — Les poules inoculées avec des doses variant entre 1/100 et 1/10.000 de milligramme meurent entre un et trois mois. A l'autopsie, on remarque que le foie et la rate sont plus ou moins hypertrophiés et criblés uniformé-

TABLEAU III.

NUMÉRO de la souche	NOMBRE de passages sur pomme de terre	DOSE de bacilles en milligramme	NUMÉRO de la poule	SURVIE en jours	AUTOPSIE
1	3	1/4.000.000	297	220	Foie et rate hypertrophiés, criblés de nodules. 2 granulations sur poulmons. Nodules sur ovaires. Lésions sur grill costal. Frottis rate : abondants bacilles acido-résistants.
	4	1/100.000	299	144	Nodules rares sur rate, nombreux sur foie. Lésions intestinales.
		1/40.000	482	39	Foie et rate hypertrophiés, parsemés de nodules. Frottis : nombreux bacilles acido-résistants.
		1/1.000	480	41	Hypertrophie foie et rate. Quelques nodules sur foie. Frottis : abondants bacilles acido-résistants dans foie, rares dans rate.
		1/40	484	30	Hypertrophie foie et rate. Frottis : nombreux bacilles acido-résistants dans foie, rate et reins.
3	2	1/1.000.000	296	156	Foie et rate très hypertrophiés avec nombreux nodules. Lésions intestinales et sur le grill costal. Frottis foie et rate : abondants bacilles acido-résistants.
	1	1/100.000	298	459	Nodules sur foie, rate, estomac, reins, poulmons et grill costal.
		1/40.000	468	48	Foie et rate hypertrophiés avec granulations comme une tête d'épingle. Frottis : rares bacilles acido-résistants.
		1/4.000	467	46	Foie et rate parsemés de granulations.
		1/40	469	35	Rate et foie très hypertrophiés avec 40 granulations sur ce dernier. Frottis : fourmillent de bacilles acido-résistants.
4	4	1/40.000.000	218	178	Foie et rate criblés de nodules. Une granulation sur poulmon. Lésions sur grill costal. Frottis foie et rate : abondants bacilles acido-résistants.
		1/4.000.000	246	99	Foie et rate parsemés de nodules. Lésions sur grill costal.
	3	1/1.000.000	294	41	Foie et rate parsemés de nodules. Frottis : rares bacilles acido-résistants.
		1/400.000	292	57	Hypertrophie foie et rate parsemés de nodules.
		1/40.000	295	58	Hypertrophie foie et rate parsemés de granulations.
	4	1/4.000	217	44	Hypertrophie foie et rate parsemés de granulations à la limite de la visibilité.
10	2	1/400.000	290	92	Hypertrophie foie et rate parsemés de fines granulations. Frottis : fourmillent de bacilles acido-résistants.
		1/4.000	294	57	Hypertrophie foie et rate parsemés de bacilles acido-résistants.
11		1/1.000.000	275	73	Légère hypertrophie foie et rate parsemés de fines granulations. Frottis : fourmillent de bacilles acido-résistants.
		1/4.000	266	47	Légère hypertrophie foie et rate parsemés de fines granulations. Frottis : fourmillent de bacilles acido-résistants.
		1/100	277	45	Hypertrophie foie et rate avec fines granulations. Frottis : fourmillent de bacilles acido-résistants.
19	2	1/100.000	117	454	Foie et rate hypertrophiés parsemés de nodules. Lésions sur intestin, muscle cardiaque et grill costal.
		1/40.000	431	63	Enorme hypertrophie foie et rate parsemés de nodules.

ment de petits nodules punctiformes de la taille d'une tête d'épingle ; ces nodules ne sont parfois nettement visibles qu'à la loupe et ont l'aspect d'un fin piqueté blanc. Il n'est pas rare de voir, dans la moelle osseuse, de tout petits abcès miliaires, qui contiennent des bacilles en abondance et qu'on voit surtout par transparence dans les os du bréchet et des côtes.

Forme chronique.— L'inoculation intraveineuse de 1/100.000 à 1/10.000.000 de milligramme détermine la mort de la poule en quatre à sept mois. Les lésions produites sont très sensiblement identiques à celles de la tuberculose naturelle des oiseaux. Les animaux restent longtemps en parfait état de santé apparent. A l'autopsie, le foie est hypertrophié et présente des granulations blanc jaunâtre, de grosseur variable, atteignant parfois celles de la tuberculose naturelle des oiseaux. Les animaux restent longtemps en parfait état de santé apparent. A l'autopsie, le foie est hypertrophié et présente des granulations blanc jaunâtre, de grosseur variable, atteignant parfois celle d'une noisette ; la rate est transformée en un conglomérat de nodules ayant le relief d'une mûre et de couleur blanc jaunâtre. On constate irrégulièrement la présence de lésions intestinales, ovariennes ou osseuses (bréchet et gril costal) ; les reins sont normaux mais les poumons contiennent assez souvent de rares granulations grises.

B. LAPIN. — Dans le tableau n° 4 sont consignés les résultats obtenus par l'inoculation intraveineuse de bacilles aviaires au lapin.

Forme aiguë, type « Yersin ». — L'inoculation intraveineuse de 1, 5 et 10 milligrammes détermine chez le lapin un processus infectieux, septicémique, type « Yersin », rapidement mortel entre 14 et 21 jours. A l'autopsie, le foie et la rate sont généralement hypertrophiés et les manifestations d'ordre toxique ou anémique sont fréquentes. Les poumons et les reins sont congestionnés et oedématiés. Il s'agit d'un syndrome qui se caractérise par l'absence constante de lésions tuberculeuses macroscopiques et la présence, aux frottis, de bacilles fourmillant dans presque tous les organes, poumons, foie, rate et moelle osseuse.

Forme subaiguë. — L'infection subaiguë se traduit chez le

TABLEAU IV.

NUMÉRO de la souche	NOMBRE de passages sur pomme de terre	DOSE de bacilles en milligrammes	NUMÉRO du lapin	SURVIE en jours	AUTOPSIE
1	1	1/10 1/4.000	D. 79 D. 75	20 42	Hypertrophie foie et rate. Frottis : abondants bacilles acido-résistants. Grosse hypertrophie foie et rate avec granulations à la limite de la visibilité. Frottis : très nombreux bacilles acido-résistants.
	3	1/10.000	D. 73	32	Hypertrophie foie et rate avec granulations sur cette dernière. Frottis : abondants bacilles acido-résistants.
		1/100.000	A. 65	118	Rares granulations sur rate, foie, reins et poumons non hypertrophiés. Ostéo-arthrites de trois des membres. Abcès sur les côtes. Frottis : fourmillent de bacilles acido-résistants dans le pus des lésions osseuses.
3	1	1/4.000.000 1/10	A. 63 A. 9	141 30	Enorme hypertrophie foie et rate avec très fines granulations. Frottis : nombreux bacilles acido-résistants.
		1/400 1/4.000	A. 14 A. 7	31 50	Enorme hypertrophie foie et rate avec granulations comme sur les poumons. Frottis viscérs : très rares bacilles acido-résistants.
	2	1/10.000	A. 5	70	Enorme hypertrophie foie et rate avec granulations comme sur reins, intestins, poumons et grill costal. Frottis foie et rate : rares bacilles acido-résistants. Quelques granulations sur reins et poumons. Neuf ostéo-arthrites purulentes à trois des membres. Frottis pus : fourmillent de bacilles acido-résistants.
4		1/100.000	A. 67	141	Hypertrophie foie et rate avec nombreux nodules. Hypertrophie des deux reins. Granulie pulmonaire bilatérale.
	4	1/1.000 1/4.000	D. 69 D. 81	40 88	Hypertrophie foie et rate avec granulations comme sur reins et poumons. Granulations sur rate, reins et poumons.
	3	1/10.000 1/400.000	A. 73 A. 73	45 142	Enorme hypertrophie foie et rate avec granulations comme sur poumons. Hypertrophie foie, rate et reins avec granulations comme sur poumons. Abcès punctiformes sur grill costal.
		1/4.000.000 1/4.000.000	A. 71 D. 56	35 40	Hypertrophie foie et rate avec nombreuses granulations.
	4	1/10.000.000	D. 52	440	Hypertrophie foie et rate avec nombreuses granulations comme sur poumons. Rate et foie avec trois granulations, trois ostéo-arthrites. Frottis pus : nombreux bacilles acido-résistants.
		1/10.000.000	D. 58	68	Hypertrophie foie et rate criblés de granulations. Lésions sur reins et poumons. Grill costal parsemé de petits abcès. Frottis rate : rares bacilles acido-résistants.
10	2	1/10 1/1.000	C. 51 C. 69	32 64	Hypertrophie foie et rate avec granulations sur cette dernière.
		1/100.000	C. 47	57	Enorme hypertrophie foie et rate. Nodules sur foie et poumons.
11	1	1/4.000 1/400.000	A. 7 A. 5	42 37	Hypertrophie foie et rate avec nodules. Broncho-pneumonie tuberculeuse. Hypertrophie foie et rate. Frottis : nombreux bacilles acido-résistants.
		1/100.000	A. 3	452	Hypertrophie foie et rate. Quelques nodules sur poumons. Frottis : pas de bacilles acido-résistants dans rate, très rares dans foie.
16	1	1/1.000.000 1/10	A. 4 D. 45 A. 59	128 14 45	Ostéo-arthrites aux quatre membres. Ostéo-arthrites aux deux membres antérieurs. Noyau caillé au testicule gauche. Enorme hypertrophie du foie. Œdème pulmonaire.

lapin par une tuberculose miliaire généralisée. Le foie et la rate sont hypertrophiés d'une manière inconstante et parsemés de nodules ; quelquefois un seul de ces organes est touché, le plus souvent la rate. Les reins, plus ou moins hypertrophiés, présentent fréquemment quelques nodules blanc nacré. La présence de lésions intestinales a été constatée rarement, surtout au niveau de l'appendice. Les poumons, de grandeur normale, contiennent un nombre variable de tubercules dont la fonte caséuse dessine des taches confluentes irrégulières. Les os plats, principalement le gril costal, montrent fréquemment par transparence de petites granulations opaques qui contiennent des bacilles.

C'est sous cette forme que le diagnostic différentiel avec le bacille bovin est le plus difficile ; cependant, en général, chez les animaux inoculés avec des souches bovines récemment isolées, les lésions pulmonaires l'emportent de beaucoup (hypertrophie des poumons et fonte caséuse des tubercules).

Forme chronique. — Chez le lapin, le tableau clinique est tout à fait caractéristique. Les lésions viscérales manquent totalement ou sont insignifiantes : rares granulations sur les reins et les poumons ; une fois sur dix, nous avons trouvé un ou plusieurs nodules sur une rate de dimensions normales.

Le fait frappant est la présence constante sur le squelette de lésions siégeant électivement dans le tissu spongieux des os courts et sur les épiphyses des os longs. Le plus souvent, on observe des polyarthrites prenant particulièrement les articulations fémoro-tibiales et tibio-tarsiennes. Néanmoins les altérations articulaires des quatre membres ne sont pas rares. Chez certains lapins, nous n'avons pas compté moins de 9 ostéo-arthrites simultanées, les articulations phalangiennes mêmes des extrémités des pattes étaient envahies.

Contrairement à ce qui arrive chez les lapins inoculés avec des bacilles bovins où le point de départ de la lésion osseuse est nettement médullaire, chez les lapins infectés avec des bacilles aviaires, il est périarticulaire. A l'ouverture d'une articulation prise, on constate que l'altération initiale commence par la membrane synoviale qui est dilatée ; la synovie est remplacée par un pus gluant et épais contenant en suspension des grumeaux fibrineux où les bacilles sont très abon-

dants Les extrémités osseuses correspondantes sont simplement congestionnées et ce n'est que dans la phase terminale qu'on observe des ulcérations et des lésions de nécrose caséuse des épiphyses.

La présence d'ostéo-arthrites tuberculeuses produites par le bacille aviaire chez le lapin est connue de longue date puisque Grancher et Ledoux-Lebard [21] la signale déjà en 1897. Viennent ensuite les observations de Cadiot, Gilbert et Roger, (arthrite du genou chez un lapin inoculé six mois auparavant avec le foie d'une poule tuberculeuse), de Weber et Bofinger (1904) qui étudient 4 cas chez des lapins inoculés depuis quatre à six mois.

Nos recherches montrent que les poules et les lapins, inoculés par voie veineuse, avec des bacilles aviaires récemment isolés, présentent des formes de tuberculose clinique en relation étroite avec le temps d'incubation. L'infection à marche rapide, aiguë, toxique, septicémique, caractérisée par l'hypertrophie des organes et l'absence de tubercules, s'observe avec des doses massives de germes. Les animaux, chez lesquels la maladie évolue entre quatre et douze semaines, sont atteints d'une forme de tuberculose subaiguë, c'est-à-dire hypertrophie moyenne des organes avec lésions nodulaires généralisées ; cette forme s'obtient par inoculation de 1/100 à 1/10.000 de milligramme. Enfin la forme clinique qui correspond à la tuberculose naturelle de la poule a été observée chez les animaux morts entre quatre et sept mois, inoculés avec 1/100.000 à 1/10.000.000 de milligramme. Pour le lapin, la forme chronique de tuberculose aviaire est caractérisée par la présence constante, sur le squelette, d'altérations siégeant électivement dans le tissu spongieux des os courts et de poly-ostéo-arthrites atteignant souvent les quatre membres, et s'observant lorsque la survie des animaux atteint quatre à sept mois.

On n'a constaté aucun écart notable de virulence entre les souches isolées qui ont tuberculisé les animaux jusqu'à la dose de 1/10.000.000 de milligramme.

VITALITÉ DES CULTURES DE BACILLES AVIAIRES.

Maffucci, Weber et Bofinger ont été les premiers auteurs à signaler des réensemencements positifs avec des cultures aviaires vieilles de plus de deux ans.

F. Griffith [22] obtient, en 1911, des cultures fertiles à partir de tubes ensemencés avec des bacilles aviaires, restés mille soixante-sept jours à la température du laboratoire. De son côté, A. S. Griffith fait des constatations identiques avec des cultures âgées de trois années.

En ce qui nous concerne, nous avons rapporté, dans un mémoire précédent, le cas d'une souche aviaire (A. N.), sur milieu à l'œuf, que nous avons réussi à repiquer après séjour de trois ans à la température du laboratoire. Depuis, nous avons fait d'autres essais avec des souches aviaires que nous avons isolées en 1931 de la rate de poules provenant des Halles de Paris ; ces souches avaient été entretenues sur milieu à l'œuf-vert malachite (n° 6 et 7) et sur pomme de terre glycélinée (n° 11 et 12) jusqu'au 3 mai 1932, date à laquelle on les a retirées de l'étuve ; on les a conservées ensuite à la température du laboratoire, à l'abri de l'air, pendant six années, c'est-à-dire jusqu'en 1938; les milieux étaient alors desséchés et ratatinés; pourtant ces cultures se montrèrent encore vivantes et donnèrent, sur pomme de terre glycélinée, dans un délai un peu plus long que la normale, des cultures fertiles ayant conservé leur aspect lisse et leur virulence initiale.

Il faut donc admettre que, dans nos conditions d'expériences, les cultures de bacilles aviaires peuvent encore être vivantes et virulentes après six ans de séjour à la température du laboratoire, à l'abri de la lumière.

D'autres recherches, entreprises dans le même sens, nous ont montré que le degré de végétabilité des cultures de bacilles aviaires dépend, en fait, de plusieurs facteurs tels que le milieu de culture, l'exubérance de la croissance et, enfin, la souche employée.

ACTION DE LA BILE SUR LES SOUCHES AVIAIRES.

Après les travaux de A. Calmette et Guérin, qui ont mis en évidence la perte de virulence des bacilles tuberculeux des mammifères (BCG), au moyen de cultures en série sur pomme de terre biliée et glycinée pendant de longues années, peu d'expériences ont été rapportées en ce qui concerne l'application de ce procédé aux souches aviaires.

En effet, en dehors des expériences sommaires de A. Griffith [23], il n'existe pas, à notre connaissance, d'autres souches aviaires biliées que celle de A. Boquet, qui servit à Harnach [24] pour ses essais de vaccination contre la tuberculose aviaire. En outre, cette souche présentait l'aspect des cultures de bacilles des mammifères ; or, comme nous le démontrerons plus loin, les souches aviaires composées de colonies R sont souvent spontanément atténuées. Il s'imposait donc d'étudier l'action de la bile sur des cultures aviaires récemment isolées, constituées exclusivement de colonies lisses, autrement dit des cultures typiques ayant conservé tous les caractères de l'espèce.

La première souche que nous avons étudiée (A. M. 7) avait été isolée, il y a six ans, de la rate d'une poule atteinte de tuberculose naturelle. Inoculée à la poule à cette époque, par voie veineuse, à la dose de 1/1.000.000 à 1 milligramme, elle tuait l'animal en quinze à cent quarante jours. A l'autopsie, on retrouvait les formes d'infection tuberculeuse aiguë, subaiguë et chronique déterminées par les souches aviaires de virulence normale que nous avons décrites précédemment.

Dès son isolement, cette souche fut reportée sur pomme de terre biliée et sur pomme de terre glycinée ; le développement était complet en vingt jours ; la culture avait un aspect crémeux, lisse, brillant, humide, blanc nacré sur milieu glyciné, vert-jaunâtre sur milieu bilié.

Au bout de quatre années de passages successifs sur ces milieux, on procède au titrage de la virulence de la souche glycinée et de la souche biliée reportée préalablement sur pomme de terre glycinée. La souche glycinée, inoculée à la dose de 1/100 à 1/100.000 de milligramme montra une virulence analogue à celle qu'elle présentait au moment de l'isolement. Ces résultats contrastèrent avec ceux donnés par la souche biliée : les animaux inoculés tolérèrent impunément des doses semblables de germes et sacrifiés six mois après se montrèrent indemnes ; les frottis de leurs organes ne contenaient pas de bacilles acido-résistants.

Un an après, c'est-à-dire douze autres passages ayant été pratiqués, toujours sur les mêmes milieux, on recherche à nouveau la virulence des deux souches, mais en inoculant à la poule des doses massives : 1/10 à 10 milligrammes. La souche glycinée se montre inchangée.

tandis que l'atténuation de virulence de la souche biliée est encore plus marquée ; les poules ayant reçu 1/10 de milligramme, sacrifiées sept mois après, ne présentent aucune lésion suspecte. Mais la perte de virulence n'est pas totale, comme le montrent les animaux inoculés avec 1 à 10 milligrammes qui, deux à cinq mois après l'inoculation, sont trouvés porteurs de lésions tuberculeuses viscérales restreintes ; c'est dire qu'il n'est plus question de tuberculose du type Yersin ; le degré d'atténuation de la virulence est mesuré par le long délai nécessaire à la tuberculisation des animaux et par les quelques lésions d'allure chronique trouvées sur les organes.

Une deuxième souche aviaire (A. N.), qui subit pendant cinq années des passages successifs sur pomme de terre biliée, en conservant l'aspect lisse initial, jusqu'à la dose de 1/100 de milligramme, se révéla parfaitement inoffensive pour la poule.

Notre troisième souche aviaire (A. M. 9) fut isolée, en même temps que la première souche, d'une tuberculose naturelle de la poule et fut soumise pareillement à l'action de la bile.

Les poules inoculées, par voie veineuse, avec 1/1.000.000 à 1/1.000 de milligramme de la souche passée pendant quatre années sur pomme de terre biliée, ne montrent aucune lésion suspecte lorsqu'on les sacrifie plusieurs mois après. Par contre, les animaux témoins inoculés avec la souche glycinée, dans les mêmes conditions, meurent tous de tuberculose généralisée dans les délais habituels.

Quelques mois après, de nouveaux passages sur milieu bilié ayant été effectués, on inocule de nouveau des poules avec 1/10 à 10 milligrammes de germes ; les résultats montrent que cette souche est en réalité moins atténuée que la première que nous avons étudiée. Bien que les délais de tuberculisation soient beaucoup plus longs qu'avec la souche glycinée correspondante, tous les animaux finirent par mourir avec des lésions tuberculeuses plus sévères que celles constatées avec notre première souche biliée.

Il ressort de ces expériences que la bile atténuée effectivement la virulence des souches de bacilles tuberculeux aviaires, très pathogènes à l'origine. Cette action est variable suivant la souche étudiée. L'atténuation est assez lente, puisqu'au bout de cinq années de passages successifs sur milieu bilié, on n'a pas abouti à une perte de virulence totale.

DISSOCIATION DU BACILLE TUBERCULEUX AVIAIRE.

Dans notre mémoire antérieur consacré à l'étude de la dissociation du bacille aviaire, nous avons donné un résumé de la bibliographie sur la variabilité microbienne en général et celle du bacille de Koch et ses variantes dissociées en particulier. Nous n'avons donc pas à y revenir ici.

L'ensemble de nos constatations s'opposant sur divers points à celles de Petroff et ses collaborateurs, nous ne rappellerons leurs expériences que dans la mesure où elles s'accordent avec les nôtres, et ne signalerons que les faits nouveaux n'ayant pas encore été relevés dans nos recherches précédentes.

Winn et Petroff [25] se sont servis, pour leur travail fondamental, d'une vieille souche aviaire, entretenue depuis plus de vingt ans (A 1), pour dissocier les trois variantes S, R, et Ch. De même Morton C. Kahn et Schwarkoff [26] ont employé des souches déjà dissociées en variété R pour obtenir la réversibilité en variété S qui représente le type initial normal du bacille aviaire.

C'est donc sur des souches aviaires récemment isolées qu'il importait de vérifier la dissociation. S'opère-t-elle *in vitro* sans aucun artifice de laboratoire, suivant un mécanisme identique à celui des souches bovines, qui, au départ, sont également constituées par des colonies S comme l'ont montré Jensen et Fridmodt-Møller [27] ? Cette recherche s'imposait d'autant plus que nulle variété plus que le bacille aviaire ne présente, lors de l'isolement, des caractères de culture plus proches de ceux décrits pour les variantes S d'autres espèces microbiennes. En effet, les colonies du bacille aviaire, sur les milieux solides, présentant un aspect gras, lisse, uni, humide, brillant, de consistance glaireuse, donnent une suspension homogène quand elles sont émulsionnées en eau physiologique comme les variantes S du groupe coli-typhique d'Arkwright.

D'autre part, ces recherches, entreprises sur des milieux électifs, devaient nous permettre de vérifier si les conclusions relatives à la dissociation des vieilles souches aviaires et aux propriétés pathogènes respectives de leurs variantes, pouvaient s'appliquer aux cultures aviaires récemment isolées.

En nous servant de 15 souches de cultures primaires de bacilles aviaires, sur milieu à l'œuf [28], dont l'origine et le mode d'isolement ont été indiqués plus haut, nous avons depuis 1934 conduit l'expérience comme suit :

Pour observer la marche de la dissociation, chaque souche venant d'être isolée fut repiquée sur milieu à l'œuf, sur pomme de terre glycélinée et dans le milieu liquide de Sauton.

MILIEU A L'ŒUF. — Les réensemencements sur milieu de Loewenstein ont été répartis de la manière suivante : une première série, laissée vingt jours à l'étuve, est ensuite placée à l'obscurité et à la température du laboratoire. Une deuxième série est divisée en deux parties : l'une est laissée intacte à l'étuve pendant de longs mois, l'autre sert à effectuer des ensemencements consécutifs, sur ce même milieu, tous les vingt jours.

Sur les milieux laissés à la température du laboratoire (25° à 32°, température d'été), on voit apparaître, plusieurs mois après, irrégulièrement, juxtaposées ou contiguës aux colonies primaires, des colonies secondaires faisant saillie mais ayant le même aspect lisse que celles dont elles sont issues.

En ce qui concerne les cultures ayant subi vingt passages successifs à l'étuve, on ne put surprendre ni l'apparition de nouveaux types de colonies, ni d'autres modifications en dehors d'une exubérance croissante de la culture à mesure qu'elle s'adaptait au milieu. Il en fut de même pour les tubes laissés à l'étuve pendant un délai de cinq à sept mois et plus, sans autre but que celui de l'observation.

En résumé, nous n'avons jamais observé sur les milieux à l'œuf, dans quelque condition qu'on les ait mis, l'apparition de colonies d'aspect différent de celles ensemencées. Aussi dès le commencement de nos recherches, avons-nous considéré le milieu à l'œuf comme celui qui conserve le mieux les caractères morphologiques de l'espèce, et depuis lors nous nous en sommes servis pour maintenir la variété S du bacille aviaire sous son aspect initial.

A cet égard, les cultures de bacilles aviaires récemment isolées se comportent, dans le milieu à l'œuf, autrement que celles de bacilles bovins. En effet, si, à l'exemple de Jensen et Fridmodt-Möller, on laisse séjourner à l'étuve, pendant des mois, des cultures primaires d'origine bovine, qui ont au départ le même aspect S que les souches aviaires, ont observé, pour certaines souches bovines, à côté des colonies lisses apparues tout d'abord, la formation de colonies rugueuses à contours irréguliers, identiques à celles du bacille humain. Ces colonies R, qui se sont développées dans de vieux milieux desséchés, reportées sur pomme de terre glycéinée, donnent des cultures

d'aspect rugueux dont le développement complet s'effectue en vingt à vingt-cinq jours.

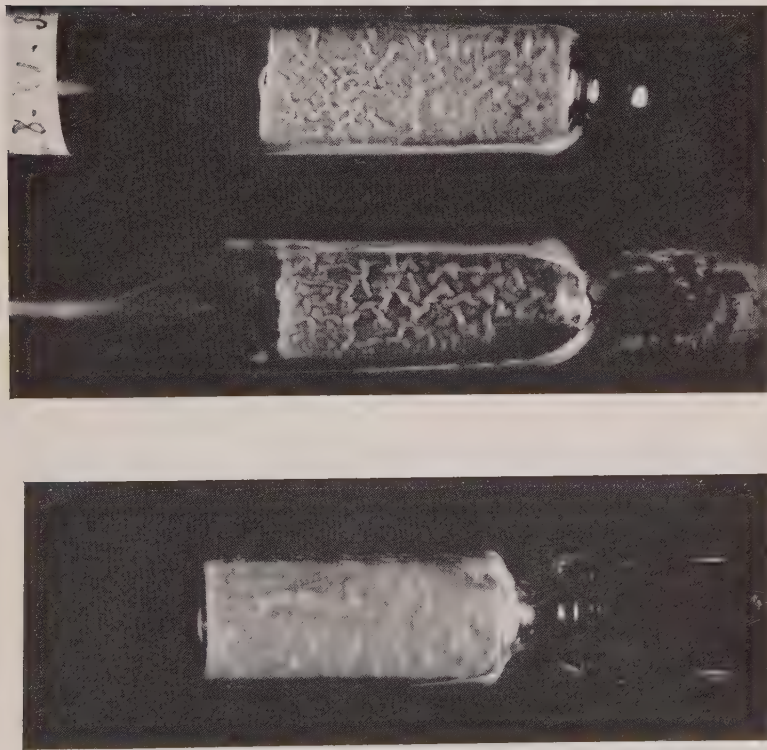
Sur 23 souches bovines lisses et dysgoniques que nous avons isolées en partant d'organes de bœuf tuberculeux, nous avons observé cinq fois, dans les cultures primaires, sur milieu à l'œuf, l'apparition de colonies rugueuses qui donnèrent par repiquage sur milieu à l'œuf et sur pomme de terre glycinée, des cultures rugueuses et eugoniques. Il faut donc admettre que le milieu à l'œuf qui s'avère tout à fait inopérant pour la dissociation des souches aviaires permet assez souvent celle des souches bovines.

Ces faits, qui opposent à l'absolue constance de la forme lisse du bacille aviaire lors des isolements, la possibilité de croissance rugueuse et eugonique du bacille bovin même dans les tubes de culture primaire, doivent faire considérer le bacille aviaire comme l'espèce la plus différenciée du genre *Mycobacterium*, beaucoup plus différenciée que ne le sont entre eux les bacilles bovin et humain.

D'ailleurs, il est surprenant de constater que les quelques souches aviaires atypiques faisant exception à cette règle, mentionnées par de rares auteurs comme s'étant développées sous la forme de culture R, identiques à celles des mammifères, étaient de vieilles souches de laboratoire ou avaient été isolées d'animaux autres que la poule. Tel est le cas de 2 souches sur 11 étudiées par Weber et Bofinger en 1924, dont l'une provenait de l'Institut Robert Koch de Berlin où elle était entretenue depuis de longues années, et l'autre d'une ostéo-arthrite d'un lapin. Il en est de même des souches isolées par L. Rabinowitsch d'un oiseau sauvage en captivité, par Eastwood et Griffith [29] en 1914 d'un porc et par Griffith [30] en 1925 d'un mouton.

POMME DE TERRE. — Tout autres sont les faits observés quand on emploie comme milieu de culture la pomme de terre glycinée qui est, comme nous l'avons démontré en 1933 [31], celui qui favorise le mieux la dissociation du bacille aviaire en variété R.

Comme précédemment, un certain nombre de tubes de pomme de terre glycinée,ensemencés avec une culture pri-



I

I. — Culture de bacille aviaire, d'aspect S sur pomme de terre glycinée, au moment de l'isolement.
 II — Cultures de bacille aviaire, se modifiant progressivement, tout en restant lisse, en prenant un aspect cérébroïde au fur et à mesure des passages (6^e et 9^e passage pour les souches ci-dessus) sur pomme de terre glycinée.
 III. — Apparition de colonies secondaires R faisant saillie sur la couche crémeuse et lisse S constituant l'ensemble de la culture. Ces colonies R s'observent, pour les trois souches ci-dessus représentées, respectivement aux 6^e, 7^e et 12^e passages sur pomme de terre glycinée, après trois à cinq mois d'étuve.

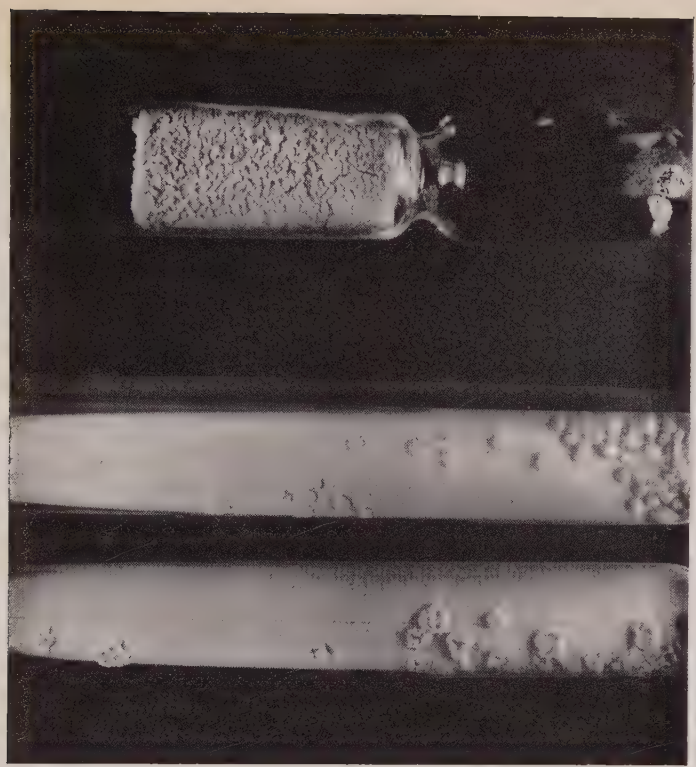


III



IV

IV. — Ensemencement d'organes de poules inoculées avec une variété R aviaire instable, récemment dissociée. Remarquer l'aspect lisse sur milieu à l'œuf et rugueux sur pomme de terre glycerinée, caractère des colonies R instables.



V

V. — Colonies R stabilisées. Le même aspect s'observe sur milieu à l'œuf et sur pomme de terre glycerinée.

naire sur milieu à l'œuf, sont conservés, après un séjour de vingt jours à l'étuve, à la température du laboratoire, à l'obscurité.

Un deuxième lot servit à effectuer des passages successifs à l'étuve ; enfin, un troisième lot fut gardé intact, pendant de longs mois, à l'étuve, aux fins d'observation.

En ce qui concerne les cultures du premier lot, maintenues à la température du laboratoire, les observations sont les mêmes que celles faites sur milieu à l'œuf, c'est-à-dire que les colonies secondaires, lorsqu'elles existent, ont le même aspect lisse que les colonies-mères sur lesquelles elles font saillie ; le bouillon ne présente aucun voile en surface ; au fond du tube se collecte un fin dépôt qui par agitation trouble uniformément le milieu.

En général, très différents ont été les résultats donnés par les tubes ayant séjourné à l'étuve, soit qu'ils aient été maintenus tels quels, soit qu'ils aient servi à effectuer des passages en série.

Notons tout d'abord que font exception aux faits que nous allons décrire 3 souches sur les 15 étudiées ; ces trois souches ont conservé, pendant dix-huit mois, indépendamment du mode d'existence qu'on leur a imposé, l'aspect en nappe, lisse, brillant et humide, sans voile sur le bouillon, qu'elles avaient primitivement.

Les 12 autres souches, au fur et à mesure des passages, perdirent progressivement leur aspect en nappe ; la culture commence par se plisser et devenir cérébroïde tout en restant lisse et grasse (planche IV, figure II). Cette modification coïncide avec l'apparition sur le bouillon d'un voile mince et lisse, adhérent aux parois du tube même si on lui imprime quelques mouvements de rotation. Parfois, sur les circonvolutions dont nous avons parlé, apparaissent des colonies secondaires R, sèches, rugueuses, mamelonnées, à bords irréguliers et contour-nés. En même temps, le voile présente des îlots de grosses colonies R sèches et poudrées.

Si, à ce moment, on repique séparément ces colonies R sur pomme de terre glycinée, on obtient des cultures pures, rugueuses, de même aspect que celles de bacilles humains.

On peut aussi arriver à la dissociation des colonies S en R

du bacille aviaire en laissant vieillir pendant des mois des cultures sur pomme de terre glycéinée à l'étuve.

Ordinairement, ces modifications ont lieu surtout sur les tubes ayant déjà subi quelques passages sur ce milieu (11 à 13 passages) plutôt que sur les tubes de cultures primaires où l'apparition de colonies R est rare. Dans ces conditions, assez souvent, on voit apparaître, sans que nous en connaissions le déterminisme, se détachant nettement, sur la culture en nappe, une ou plusieurs colonies secondaires rugueuses, sèches, à bords irréguliers, se développant rapidement (planche IV, figure III). Simultanément se développe un voile plissé, sec, rugueux, qui, par agitation, ne donne plus de suspension homogène mais des grumeaux.

Comme précédemment, ces colonies R, reportées sur pomme de terre glycéinée, fournissent des cultures rugueuses, luxuriantes, identiques à celles de bacilles humains.

MILIEU DE SAUTON. — La culture des souches aviaires récemment isolées dans le milieu liquide synthétique de Sauton, ajusté à un pH de 7,2, donne un développement en profondeur qui se manifeste par un trouble du milieu, pendant les deux premières semaines d'étuve. Dans la suite, le liquide se clarifie et la culture se dépose en flocons. Ce moment coïncide avec l'apparition d'un voile mince et lisse en surface. Un voile identique se reforme en quelques jours si on fait tomber le précédent au fond du vase, par agitation. On peut obtenir facilement la dissociation dans ce milieu liquide à condition de laisser les ballons pendant plusieurs mois à l'étuve, en moyenne trois. On observe alors que le voile, lisse dans l'ensemble, présente quelques zones d'aspect sec et rugueux, formant de véritables stalactites de colonies R en profondeur. Si on agite, le liquide ne se trouble plus. Le dépôt se trouve alors formé de deux couches distinctes, l'une inférieure est constituée par une masse compacte qui correspond au premier développement S de la culture. La couche supérieure est composée par des particules beaucoup plus grosses qui représentent en partie les colonies R que nous avons constatées dans le voile. Les zones R du voile, reportées sur pomme de terre glycéinée, donnent en deux semaines d'étuve une culture

rugueuse, d'aspect R typique, avec un voile ridé et sec sur le bouillon.

Des constatations précédentes, il résulte que le milieu à l'œuf est le plus favorable pour la conservation de la variante S, et la pomme de terre glycérinée pour la variante R. C'est donc sur ces deux milieux que nous entretenons les variantes S et R de chaque souche aviaire. Ces milieux ont l'avantage de maintenir inchangés les caractères cultureux initiaux malgré les repiquages successifs.

CARACTÈRES ET PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DES VARIANTES S ET R RÉCEMMENT ISOLÉES.

En faisant des dilutions de culture R aviaires récemment dissociées et en les ensemençant sur milieu de Loewenstein, on n'obtient, la plupart du temps, lors des premiers passages, que des colonies S et on n'observe qu'exceptionnellement de rares colonies R. Mais ces colonies, d'aspect lisse et gras, ne se différenciant en rien des cultures S aviaires apparues sur milieu à l'œuf au moment de l'isolement, donnent à nouveau des cultures d'aspect R lorsqu'on les reporte sur pomme de terre. Plus encore, pour quelques-unes de ces cultures R sur pomme de terre glycérinée, surtout lorsqu'on ne les repique pas précocement, il nous est arrivé de remarquer, entre les circonvolutions rugueuses de la culture, l'apparition de quelques colonies de formation secondaire parfaitement rondes, lisses et blanches, parfois de si faibles dimensions qu'elles ne sont visibles qu'à la loupe (4).

Il restait à savoir si la différence d'aspect morphologique des variantes S et R s'accompagnait d'une différence dans le pouvoir pathogène.

Nous avons effectué cette recherche sur la poule, en nous servant de cultures R et S pures, de même âge sur pomme de

(4) Deux fois, nous avons eu l'occasion d'observer que cette transformation s'est poursuivie encore plus loin ; l'ensemble tout entier formé par la culture R, rugueux et sec, se nivelle, devient gras et lisse, comme si les colonies R subissaient une sorte de lyse ; finalement, on observe une culture parfaitement unie et brillante, formée de petits dômes parfaitement ronds, comme les colonies S du bacille aviaire.

TABLEAU V.

NUMÉRO de la souche	NOMBRE de passages sur pomme de terre	DOSE de bacilles en milligramme	NUMÉRO de la poule	SURVIE en jours	AUTOPSIE
1S.	3	1/1.000.000	297	220	Hypertrophie des organes parsemés de granulations. Lésions osseuses.
		1/100.000	299	144	Lésions généralisées sur les organes.
	1	1/10.000	182	59	Lésions généralisées sur les organes.
		1/1.000	180	41	Hypertrophie des organes avec rares nodules sur le foie.
		1/10	181	30	Hypertrophie des organes.
1R.		1/1.000.000	354	483	Lésions rares sur le foie. Bréchet pris.
		1/1.000	353	67	Légère hypertrophie des organes avec granulations.
		1/100	308	30	Organes parsemés de granulations.
		1	310	45	Granulations à la limite de la visibilité sur la rate.
13S.	5	1/100.000	27	298	Nodules sur le foie. Lésions osseuses.
		1/1.000	28	62	Lésions sur les organes.
		1/100	24	32	Hypertrophie des organes avec fines granulations.
13R.		1/100.000	25	152	Hypertrophie des organes avec granulations.
		1/1.000	29	48	Hypertrophie des organes avec granulations.
		1/100	26	62	Hypertrophie des organes avec granulations.
11S.		1/1.000.000	275	73	Lésions généralisées sur les organes.
		1/1.000	266	47	Lésions généralisées sur les organes.
		1/100	277	45	Lésions généralisées sur les organes.
11R.		1/100	313	32	Hypertrophie des organes avec lésions.
		1	306	28	Hypertrophie des organes avec lésions.
10S.	2	1/100.000	290	92	Lésions généralisées.
		1/1.000	291	57	Lésions généralisées.
10R.		1/1.000.000	359	324	Rien de suspect.
		1/10.000	360	44	Quelques nodules sur le foie et la rate.
		1/1.000	362	406	Lésions généralisées.

terre glycinée. A titre d'exemples, nous donnons dans le tableau V les résultats que nous avons obtenus avec 4 des souches étudiées.

Il semble que la variété R détermine chez la poule une hypertrophie moins marquée des organes que la variété S et que le nombre de bacilles soit également moins important sur les frottis. Mais en fait, compte tenu des variations inhérentes à toute expérience biologique, on peut dire qu'aucune différence appréciable ne fut observée dans la virulence des variantes R et S récemment isolées.

Stamatin et Tomescu [32] en étudiant la variété S comparativement à la variété R de 5 souches, l'ont trouvée d'une virulence supérieure, égale ou même inférieure à cette dernière.

ÉVOLUTION DES VARIANTES S ET R DES SOUCHES AVIAIRES *in vitro* ET *in vivo*.

Nous venons d'exposer comment, en se servant de la pomme de terre glycinée ou du milieu liquide de Sauton, il est facile pour la plupart des souches, très difficile ou impossible pour d'autres, de transformer la variété S initiale en variété R correspondante. Nous avons réussi 12 fois sur 15 cette transformation ; dans 3 cas, tous nos essais de dissociation ont échoué.

En ce qui concerne les cultures R récemment dissociées, elles sont instables et donnent des résultats variables. *In vitro*, elles conservent leur aspect sur pomme de terre glycinée à condition d'effectuer des repiquages précoces. Mais nous avons vu que si, à l'occasion des premiers repiquages, on pratique des dilutions qu'on ensemence sur milieu à l'œuf, on obtient en général des colonies uniquement S qui, reportées sur pomme de terre, redonnent d'emblée une culture R ; rarement, on constate sur milieu à l'œuf parmi de nombreuses colonies S, certaines colonies d'aspect R.

In vivo, il existe un parallélisme étroit entre les résultats variables observés *in vitro*. Parfois, les colonies R inoculées, lors des premiers passages, à la poule ou au lapin ne donnent ensuite, par ensemencement des organes, que des colonies S sur pomme de terre glycinée comme sur milieu à l'œuf. Mais le

plus souvent elles fournissent des cultures d'aspect S, sur milieu à l'œuf mais d'aspect R sur pomme de terre ; rarement on peut constater sur ce dernier milieu un mélange de colonies lisses et rugueuses. Dans cette période instable, les cultures R et S jouissent, comme nous l'avons vu, d'un même effet pathogène et il est très facile, par divers artifices de laboratoire *in vivo* ou *in vitro*, de mettre en évidence leur réversibilité. Des photographies illustrent ces exemples (planche V, figure IV).

Mais, sans que jusqu'à présent nous puissions connaître le déterminisme d'un tel phénomène, en effectuant sur pomme de terre glycélinée des passages répétés de certaines de ces cultures R instables, il arrive qu'elles finissent par donner des cultures pures R ; cet aspect se conserve et sur milieu à l'œuf et sur pomme de terre ; à ce stade, correspond une stabilisation complète de cette forme R, tant *in vivo* qu'*in vitro*, puisque l'ensemencement des organes d'animaux inoculés ne fournit que des cultures pures R, de même aspect que les cultures des bacilles des mammifères (planche V, figure V). La pigmentation plus ou moins intense des premières serait l'unique différence d'avec les souches des mammifères. Ce type de colonies que nous appellerons R stable, irréversible puisqu'il devient impossible de revenir à la forme S primitive, est très difficile à obtenir en partant de cultures récemment isolées. Dans nos recherches en cours, nous ne l'avons observé que trois fois sur une trentaine de souches étudiées. A notre connaissance, de toutes les souches de laboratoire, la seule qui présente de tels caractères est une souche aviaire « Boquet », de virulence dégradée par des passages successifs sur pomme de terre biliée. Sans vouloir tirer de conclusion générale, il nous paraît intéressant de signaler que pour l'une de ces souches R stables, il y a eu perte complète de la virulence.

La variété S de cette souche, étudiée depuis 1934 [33], inoculée par voie intraveineuse à la poule et au lapin, tue ces animaux aux doses de 1 à 1/10.000.000 de milligramme en dix-huit à cent quarante jours, avec les syndromes d'infection tuberculeuse aiguë, subaiguë ou chronique décrits précédemment.

Les colonies S de la culture originale, sur milieu de Loewen-

stein, conservées à la température du laboratoire, ont été reportées sur pomme de terre glycinée, au bout de deux, trois et quatre années. Ces différentes sous-cultures présentaient le même aspect et la même virulence que la culture S originale.

Par contre, la variété R, obtenue par repiquage de colonies R secondaires apparues à la surface d'une culture d'aspect S typique (16^e passage sur pomme de terre glycinée), s'est avérée, dès les premiers passages sur pomme de terre glycinée, moins virulente que la variété S correspondante (5). Au 24^e passage, c'est-à-dire deux ans après l'isolement, elle ne tuait plus la poule qu'aux doses de 1 à 10 milligrammes, en quatre à six mois. Au bout de quatre années, au fur et à mesure des passages *in vitro*, cette variété R était devenue tout à fait avirulente, pour les animaux sensibles. Pour écarter toute cause d'erreur, nous avons isolé d'un 44^e passage sur pomme de terre de la variété S originale, une deuxième culture d'aspect rugueux que nous dénommerons R², et qui, comme celle obtenue trois années auparavant, s'est montrée moins virulente que la variété S correspondante. En effet, la variété S, inoculée à 8 poules, a déterminé la mort de ces animaux, aux doses de 10 milligrammes à 1/10.000, entre dix-huit et soixante jours, c'est-à-dire dans des délais sensiblement normaux. Par contre, sur 12 poules, qui avaient reçu, dans les mêmes conditions, la variété R² et qui moururent spontanément ou furent sacrifiées dans un délai de un à cinq mois, 5 étaient indemnes (1/10 à 1/100 de milligramme), et les 7 dernières présentaient des lésions discrètes de tuberculose.

Parallèlement, on observait que les organes des animaux inoculés avec la variété R primitive donnaient par culture tout d'abord un mélange de colonies R et S sur milieu de Loewenstein. Mais l'ensemencement des organes d'animaux inoculés avec la variété R ayant passé 41 fois sur pomme de terre glycinée, ne fournit pour ainsi dire qu'une culture exclusivement R ; en effet, sur 24 tubes ensemencés dans une expérience, et parmi des centaines de colonies R, on put seulement en compter deux d'aspect S.

(5) Ces résultats ont été confirmés avec la même souche aviaire par Bruno Besta [34], à l'Institut Robert Koch.

Au 52^e passage, la variété R est tout à fait avirulente pour les animaux sensibles. En l'inoculant à 2 poules, 2 lapins et 2 cobayes et en sacrifiant, entre trente-trois et quatre-vingts jours, tous ces animaux, leur rate prélevée aseptiquement et ensemencée ne permit d'obtenir que des colonies R pures sur un ensemble de 14 tubes de milieu de Loewenstein

Pour s'assurer de la stabilité de la variété R, on effectua à cette époque les ensemencements suivants :

Une culture de la variété R 52, isolée d'une poule de l'expérience précédente, sert à faire des dilutions en eau physiologique de concentration décroissante jusqu'à 1/10.000.000 de milligramme par centimètre cube. Certaines de ces émulsions microbiennes furent ensuite ensemencées séparément sur des tubes de Loewenstein et donnèrent au total : la dilution à 1/10.000, sur 4 tubes, 67 colonies (0 c. c. 25 par tube); la dilution à 1/1.000.000, sur 20 tubes, 21 colonies (1 goutte par tube); la dilution à 1/10.000.000, sur 10 tubes, 4 colonies (11 gouttes par tube); il est à remarquer que toutes ces colonies étaient d'aspect R typique. Ce résultat fut confirmé dans la suite par d'autres expériences.

En résumé, on a pu constater pour cette souche, au fur et à mesure des passages sur pomme de terre glycinée, que la variété R perdait progressivement toute virulence pour les animaux sensibles en même temps qu'elle se stabilisait : autrement dit, à partir de la variété R, et même après passages *in vivo* ou *in vitro*, il devenait impossible de revenir à la forme S primitive. Et par inoculation chez les animaux, la variété R de la souche étudiée se montrait, au 52^e passage sur pomme de terre, d'une innocuité totale et d'une stabilité parfaite tant *in vivo* qu'*in vitro*.

Mais on n'observe pas pour toutes les souches aviaires que la variété R arrivée à stabilisation perde sa virulence, ou qu'elle diffère en virulence de la variété S. Pour 2 autres souches stabilisées, nous avons en effet constaté, pour l'une d'entre elles, une conservation de la virulence de la variété R qui était égale à celle de la variété S : pour l'autre, une perte de virulence égale pour les variétés R et S.

Mais à côté des variétés R stables, il existe également des cultures S stables : ainsi les trois souches mentionnées plus haut, que nous entretenons depuis plusieurs années sur pomme de terre glycinée, indépendamment des conditions d'existence auxquelles elles furent soumises, soit *in vitro*, soit *in*

vivo, ont toujours conservé l'aspect initial S. Inoculées à doses convenables à la poule, ces cultures reproduisent la maladie naturelle, montrant une virulence normale. Par culture des organes de cet animal, on n'obtient que des colonies S.

Et cependant, la virulence de la variété S stable ne reste pas toujours invariable, même si ses caractères de culture demeurent inchangés. La diminution et même la perte de virulence peut s'opérer tout aussi bien pour cette variété S stable que pour la variété R. Voici le résumé des expériences qui le prouvent :

Notre première souche aviaire [35] avait été isolée directement, il y a six années, de la moelle osseuse d'un cas de tuberculose naturelle de la poule, selon la technique de « myéloculture » que nous avons décrite.

Lors de son isolement sur 4 tubes de milieu à l'œuf, cette souche (poule 2) se présentait sous l'aspect d'une culture lisse, crémeuse, humide, de couleur blanc nacré, aspect caractéristique des souches aviaires. L'étude de sa virulence, au moment de son isolement en 1931, montrait que, inoculée par voie intraveineuse jusqu'aux doses de 1 milligramme à 1/10.000.000 de milligramme, elle tuait la poule et le lapin en dix-huit à cent quarante jours ; les animaux ainsi inoculés présentaient les formes anatomo-cliniques de l'infection tuberculeuse aviaire aiguë, subaiguë ou chronique.

Les colonies S de la culture primaire de cette souche sur milieu de Loewenstein furent reportées sur pomme de terre glycinée. Depuis lors, pendant quatre années successivement, nous avons repiqué cette souche 44 fois sur ce même milieu. Or, malgré ces passages répétés, elle conservait sur pomme de terre l'aspect lisse initial. C'est dire que la souche que nous étudions était bien constituée par la variante S à l'état de pureté, puisqu'elle présentait le même aspect lisse, aussi bien sur milieu à l'œuf que sur pomme de terre.

Le 21 mai 1937, alors que cette souche (poule 2), avait subi quatre années de passages sur pomme de terre glycinée, conservant ses caractères S lisses primitifs, on procéda à un nouveau titrage de la virulence. On inocula à 4 poules, par voie intraveineuse, respectivement les doses de 1/100, 1/1.000, 1/10.000 et 1/100.000 de milligramme.

Aucune ne mourut spontanément. Sacrifiés cinq mois après l'inoculation, 3 animaux sur 4 se montrèrent indemnes de toute lésion suspecte de tuberculose. Seule la poule inoculée avec 1/100 de milligramme présenta des lésions et encore n'avait-elle qu'une rate légèrement hypertrophiée, mais parsemée de nodules blanc nacré caractéristiques de la tuberculose aviaire. Il semble bien que la raison apparente de la diminution de virulence de la souche en cause doive être recherchée dans les passages successifs sur pomme de terre glycinée, car la culture primaire sur milieu à l'œuf, conservée à la température du laboratoire et inoculée au bout de quatre années, après repiquage préalable, possédait pour la poule, aux doses de 1/1.000 et 1/100.000 de milligramme à peu près la même virulence que lors de l'isolement.

La deuxième souche, qui se présente comme la précédente sous un aspect lisse dans les différents milieux de culture, avait été isolée d'une poule tuberculeuse il y a six ans. Une année après, elle tuberculisait la poule en cent vingt jours, à la dose de 1/1.000.000 de milligramme. Un nouveau titrage de sa virulence effectué il y a quelques mois, alors que la souche conservait son aspect lisse S typique, malgré ses 36 passages sur pomme de terre glycinée pratiqués au cours de cinq années, montra qu'elle ne tuait la poule qu'à la dose massive de 1/10 de milligramme. La mort survenait en cinquante à soixante jours avec des lésions nodulaires tuberculeuses typiques sur le foie et la rate.

Ces résultats d'ailleurs ne sont pas pour nous surprendre. En effet, ils sont superposables à ceux que nous montra l'étude de la virulence des deux souches aviaires désignées sous le nom de Poule 1 et Dinde 2, employées dans nos laboratoires pour la préparation de la tuberculine aviaire. Ces deux souches entretenues depuis plus de vingt ans, conservent l'aspect typique S, sur milieu à l'œuf et sur pomme de terre glycinée. Inoculées à la poule par voie veineuse et à la dose massive de 1/10 à 1 milligramme, elles se montrent tout à fait inoffensives ; les animaux ainsi inoculés, sacrifiés quatre mois après, furent trouvés indemnes.

Ces expériences démontrent donc que des souches aviaires, composées exclusivement de la variante S, stables pendant plusieurs années et au cours de très nombreux passages *in vitro*, n'en perdent pas moins leur virulence. Pour l'une des souches étudiées, la raison de la diminution de virulence semble avoir été les passages, pendant plusieurs années, sur pomme de terre glycinée.

L'importance de ces recherches réside dans le fait qu'elles indiquent, avec toute la netteté désirable, tout d'abord que la perte de virulence des souches aviaires peut indistinctement survenir chez les deux variantes R et S stabilisées, et ensuite qu'il n'y a pas de relation entre l'aspect de la culture et la virulence de la souche.

EXISTE-T-IL UNE VARIÉTÉ CHROMOGÈNE CH. DANS LES SOUCHES DE BACILLES AVIAIRES ?

Continuant cet exposé, il nous faut dire que parmi les souches aviaires étudiées, 2 (n^{os} 13 et 14), qui provenaient d'une tuberculose cliniquement identique à celle toujours constatée chez la poule, se présentèrent sur milieu à l'œuf d'emblée et *in toto* comme formées de colonies ayant morphologiquement tous les caractères des aviaires sauf qu'elles

étaient fortement pigmentées [36]. Cette pigmentation intense, très différente de celle que montrent parfois les colonies de bacilles humains, est jaune citron. Elle attire de suite l'attention car, étant donné la couleur verte du milieu de culture, elle contraste nettement avec l'aspect blanc-nacré qu'on est habitué à rencontrer lorsqu'il s'agit d'isolement de bacilles aviaires.

Winn et Petroff ont été les premiers à décrire ces colonies pigmentées dans les souches aviaires ; ils avaient observé l'apparition de cette coloration en exposant des colonies S non pigmentées à une haute température. Selon eux, cette pigmentation qui serait uniquement portée par les colonies S, constituerait une variété autonome Ch. qui se différencierait radicalement des colonies S en ce qu'elle est avirulente pour la poule.

En ce qui nous concerne, nous avons obtenu cette variété Ch dans les trois circonstances suivantes :

Tout d'abord, d'emblée dans des cultures primaires, toutes les colonies se trouvèrent pigmentées comme celles que nous venons d'indiquer précédemment.

Ensuite, en partant de fragments d'organes, nous avons pu observer parfois, sur milieu à l'œuf, qu'à côté d'innombrables colonies S blanc nacré se trouvait un nombre de colonies pigmentées beaucoup plus restreint. D'autres fois, ce sont des cultures qui s'étaient développées uniquement sous la forme de colonies blanc nacré et qui, une fois retirées de l'étuve, présentèrent au bout d'un certain temps quelques colonies qui se distinguaient par leur pigmentation. Nous ne pouvons dire s'il s'agissait de colonies venant d'apparaître ou de colonies préexistantes qui se seraient colorées.

Enfin, nous avons observé la pigmentation totale de toute la culture en maintenant à la température du laboratoire des cultures sur milieu à l'œuf qui s'étaient développées à l'étuve sous la forme de colonies uniquement blanc nacré. Cette pigmentation qui va du jaune citron à l'ocre jaune, dépend de la souche employée, du milieu de culture (le milieu à l'œuf est plus favorable au développement de la pigmentation que la pomme de terre glycinée) et surtout de la température de conservation des souches, et de la lumière à laquelle elles sont exposées.

Cette pigmentation, qui se maintient à la température du laboratoire, se perd au fur et à mesure des passages effectués à l'étuve, sur divers milieux, et particulièrement sur pomme de terre glycinée. Mais, contrairement aux observations de Petroff, cette pigmentation peut porter indistinctement sur la variété S ou la variété R du bacille aviaire. A titre d'exemple de ce que nous affirmons, nous pouvons indiquer que les deux souches lisses et pigmentées dont il est question plus haut, se sont transformées assez facilement, par passages successifs sur pomme de terre glycinée, en variété R correspondante; or, lors des premiers passages, cette variété R s'était montrée aussi pigmentée que la variété S dont elle était issue. Cette pigmentation, qui s'était parfaitement conservée au cours des premiers repiquages à l'étuve à 37°, disparut progressivement dans la suite.

Des cultures sur divers milieux de 6 souches aviaires pigmentées sont représentées figure 1; l'intensité de la pigmentation, variable suivant le milieu, porte aussi bien sur les colonies S que sur la variété R stabilisée ou non de ces souches.

En ce qui concerne la nature de ce pigment, l'unique chose que nous pouvons dire est que sa nature semble différente de celle des lipochromes. En effet, les corps microbiens pigmentés, soumis à l'action de l'alcool, l'éther et l'acétone, ne laissent diffuser aucun pigment dans ces liquides.

Nos constatations sur la virulence de la variété Ch. sont en complète opposition avec celles de Petroff. Nous avons titré la virulence des deux souches dont il a été question plus haut, sur la poule et le lapin, par voie veineuse, en nous servant de cultures pures sur pomme de terre glycinée des variantes S et R fortement pigmentées.

Voici quels furent les résultats :

La souche aviaire 13 fut inoculée, à des doses allant de 1/100 à 1/100.000 de milligramme, à 6 poules, dont 3 avec la variante S et 3 avec la variante R. Toutes sont mortes de tuberculose, entre un et cinq mois. A l'autopsie, le foie et la rate, plus ou moins hypertrophiés, étaient criblés de nodules blanc-nacré, lésions qui caractérisent l'infection subaiguë ou chronique de la tuberculose aviaire; il a été impossible de constater des différences appréciables dans la virulence des deux variétés S et R ainsi éprouvées.

6 lapins, ayant reçu de 1/100 à 1/10.000 de milligramme, soit de la variété S, soit de la variété R sont tous morts entre trente et quatre-



FIG. 1. — Six des différentes de bacilles aviaires, ayant toutes une pigmentation intense, soit qu'elles présentent l'aspect R comme sur les trois tubes 1, 2 et 4, soit qu'elles aient l'aspect S comme sur les trois tubes 3, 5 et 6.

vingt-dix-sept jours ; tous présentèrent les signes d'une tuberculose miliaire. Aucune différence notable ne fut constatée au point de vue virulence, que les animaux aient été inoculés avec l'une ou l'autre des variantes.

La virulence des variétés R et S pigmentées de la souche 14 fut de même étudiée, à des doses allant de 1/100 à 1/100.000 de milligramme chez la poule et le lapin. Les résultats obtenus ont été superposables à ceux donnés par la souche 13.

En effet, 3 poules et 3 lapins inoculés avec la variante S et le même nombre d'animaux inoculés avec la variété R de la souche 14, sont tous morts de tuberculose dans des délais plus ou moins courts en rapport avec la dose employée. Ainsi, aucune différence ne put être mise en évidence dans la virulence des variantes étudiées.

Il ressort de l'ensemble de nos constatations qu'il peut apparaître sur les colonies S ou R, stabilisées ou non, du bacille aviaire, un pigment dont l'intensité dépend de la souche, du milieu de culture et de la température d'incubation. La nature de ce pigment semble être différente de celle des lipochromes. Cette pigmentation disparaît au fur et à mesure des passages successifs sur pomme de terre glycinée, à l'étuve. La présence de ce pigment ne modifie en rien la virulence et les caractères morphologiques des souches qui le portent.

Pour toutes ces raisons, nous considérons que l'apparition du pigment, soumise à des contingences variables et à déterminisme encore obscur, ne suffit pas à poser le problème d'une variété autonome nouvelle du bacille aviaire.

COMMENT DISTINGUER DES BACILLES AVIAIRES AVIRULENTS, SE PRÉSENTANT SOUS LES VARIÉTÉS S ET R STABILISÉES, D'AUTRES BACILLES TUBERCULEUX ATTÉNUÉS SE PRÉSENTANT SOUS LE MÊME ASPECT.

Nous avons démontré qu'il peut exister des souches de bacilles aviaires, parfaitement stabilisées sous la forme S ou R, qui sont tout à fait avirulentes pour la poule. Comme d'autres bacilles tuberculeux atténués peuvent se présenter sous le même aspect, l'identification d'une souche donnée atténuée peut offrir de réelles difficultés au bactériologiste.

Différents caractères permettent cependant ce diagnostic, qui se pose surtout entre les bacilles aviaires avirulents, les bacilles isolés du cobaye neuf (37) d'aspect S, et certains bacilles atténués des mammifères d'aspect R tels que le BCG

1° LA MORPHOLOGIE. — Cultivés sur des milieux pauvres comme la gélose glycinée ou conservés pendant de longs mois à la température du laboratoire, seuls les bacilles aviaires montrent, quelle que soit la variété en cause, un pléomorphisme et un polymorphisme accentués, avec formes ramifiées ou renflées en massue aux extrémités. Jamais les bacilles des mammifères ou les bacilles issus du cobaye neuf ne nous ont, dans les mêmes conditions, montré de pareils aspects.

2° LA PIGMENTATION. — Ici, la différence réside à la fois dans l'intensité et dans la nature chimique du pigment. La pigmentation des souches aviaires R ou S, surtout après un séjour de plusieurs mois à la température du laboratoire, s'observe fréquemment, mais elle va du jaune citron à l'ocre jaune, tandis que celle des bacilles des mammifères, bien plus terne, est d'un jaune paille. Chimiquement, le pigment des bacilles aviaires n'est pas soluble dans l'acétone ; ce n'est donc pas un lipochrome comme celui des paratuberculeux.

3° LA TUBERCULINE. — La tuberculine du bacille aviaire étant au moins dix fois moins toxique que celle des bacilles des mammifères (Boquet et Ninni) [38], on peut distinguer un bacille des mammifères atténué comme le BCG d'un aviaire atténué, se développant sous le même aspect R, par l'action de leur tuberculine respective sur un cobaye tuberculeux. En effet, alors que des animaux tuberculisés depuis huit semaines mouraient, après injection de 30 à 40 centigrammes de tuberculine BCG, en vingt-quatre à quarante-huit heures d'intoxication tuberculinique, ils supportaient sans le moindre trouble 1 gramme et davantage de tuberculine provenant de 3 souches dont la nature aviaire était à démontrer. Manifestement, il s'agissait donc d'une tuberculine aviaire et les 3 souches furent identifiées comme souches aviaires atténuées, stabilisées sous la forme R (A.N., Boquet R, B.R.).

De plus, les différences locales des réactions tuberculiniques peuvent également servir. Car des cobayes tuberculeux ne répondaient guère à l'injection intradermique de 1/10 de cent. cube de tuberculine aviaire diluée au 1/100. alors que la même dilution de tuberculine BCG donnait encore une belle papule.

4° LE POUVOIR PATHOGENE. — De tous les caractères spécifiques à chaque germe, le plus important, et celui qui mérite le plus d'être retenu, est certainement la différence de pouvoir pathogène pour le lapin.

En effet, nous avons montré précédemment que les souches aviaires récemment isolées, inoculées au lapin à des doses paucibacillaires, par voie intraveineuse, produisent des ostéo-arthropathies constantes qui évoluent lentement en quatre à six mois. Cette affinité particulière de l'espèce aviaire pour les articulations du lapin avait été signalée dès 1891. Il appartient en effet à Courmont et Dor [39] d'avoir observé les premiers la présence d'ostéo-arthrites tuberculeuses multiples chez 5 lapins inoculés avec une souche aviaire plus ou moins virulente.

Mais il est hors de doute qu'il revient à S. Griffith [40] d'avoir su tirer parti de ces constatations en montrant la régularité de l'atteinte des articulations du lapin par les souches aviaires atténuées. C'est en 1923 qu'il démontre tout le profit qu'on peut tirer de cette action pathogène remarquable en identifiant par ce moyen deux souches aviaires avirulentes d'aspect S qui lui avaient été envoyées sous l'étiquette de souches bovines.

En suivant les directives de Griffith, nous avons confirmé pleinement ses constatations.

Pour opérer avec le maximum de chance de réussite, il est nécessaire de se servir de jeunes lapins, pesant entre 1.500 et 2.000 gr., et d'employer, par voie intraveineuse, des doses massives de germes, 1 et plutôt 5 et 10 milligrammes. L'infection reste latente pendant fort longtemps et ce n'est qu'après cinq à sept mois d'observation que l'on remarque un amaigrissement progressif des animaux.

Caractère important, avec les souches aviaires avirulentes, ce sont surtout les petites articulations (carpe, métacarpe, tarse, métatarse) qui sont prises tandis que nous avons vu, au contraire, que les souches de même origine mais virulentes, s'attaquaient de préférence aux articulations importantes. La lésion est la même dans les deux cas : la synoviale se prend tout d'abord ; elle s'épaissit, se remplit d'un liquide glaireux puis purulent qui montre des bacilles à l'exa-

TABLEAU VI.

ESPÈCE bacillaire	ASPECT de culture	MORPHOLOGIE	PIGMENTATION	TUBERCULINE	POUVOIR PATHOGÈNE pour le lapin	
					Voie intra- veineuse	Voie sous-occipitale
Bacille aviaire atténué.	S. ou R.	Germes polymorphes, ramifiés et en massue.	Fréquente allant du jaune citron au jaune ocre.	Peu active.	Ostéo- arthrites.	Nul.
Bacille isolé du cobaye neuf.	S.	Pas de formes atypiques.	Germes non pigmentés.	Peu active.	Nul.	Méningite sans granulations.
BCG.	R.	Pas de formes atypiques.	Jaunâtre peu intense.	10 fois plus active que la tuberculine aviaire.	Nul.	Nul.

men direct. Par ensemencement, on récupère facilement la souche primitive.

Griffith avait émis l'hypothèse que ce pouvoir pathogène si particulier s'observe non seulement de manière régulière mais encore de manière indéfinie. Nous avons pu démontrer l'exactitude de cette hypothèse puisque sur les 5 souches de bacilles aviaires avirulents, inoculées par nous au lapin et qui donnèrent toutes les lésions sus-décrites, une seule n'avait été isolée qu'en 1934 (A.N.), les 4 autres étant entretenues depuis plus de vingt ans dans nos laboratoires et servant à la fabrication de la tuberculine aviaire. Malgré leur âge considérable, ces souches gardaient donc intact leur pouvoir pathogène particulier pour le lapin.

5° Un dernier caractère différentiel réside dans les résultats de l'inoculation sous-occipitale au lapin, selon le procédé de A. Boquet [41].

L'inoculation sous-occipitale des 4 souches aviaires avirulentes précitées, aux doses de 1/100 à 1 milligramme laissa parfaitement indemnes les 17 lapins employés. Par contre, 8 lapins, inoculés par la même voie et aux mêmes doses, avec des bacilles issus du cobaye neuf, succombèrent toujours, en des

délais de quinze à trente jours : les animaux présentaient à l'autopsie une congestion des méninges, sans granulations apparentes. Ainsi alors que le bacille issu du cobaye neuf est pathogène pour le lapin par voie sous-occipitale, et inoffensif par voie intraveineuse, les bacilles aviaires atténués sont inoffensifs par voie sous-occipitale et pathogènes par voie intraveineuse. Ces deux variétés de bacilles présentent donc des propriétés pathogènes opposées, permettant de les différencier parfaitement et démontrant que le bacille issu du cobaye neuf est bien une espèce microbienne différente.

Les caractères distinctifs des diverses espèces bacillaires que nous venons de signaler sont consignés dans le tableau de la page précédente.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Les milieux à base d'œuf glycérimés sont les plus favorables à l'isolement du bacille aviaire.

2° Les cultures de bacilles aviaires, sur milieu à l'œuf ou sur pomme de terre, peuvent se montrer fertiles et virulentes après un séjour de six ans à la température du laboratoire. Elles conservent alors intacts leurs caractères de culture initiaux.

3° Le polymorphisme morphologique que peut présenter le bacille aviaire n'a jamais été observé pour les bacilles des mammifères. La constatation de ce caractère chez une souche donnée a donc une valeur diagnostique réelle pour établir son origine aviaire.

4° La voie d'infection naturelle dans la tuberculose de la poule est bien la voie digestive. La tuberculose ainsi contractée se caractérise par sa longue période d'incubation. L'ingestion d'organes broyés de poules tuberculeuses se montre plus virulente que l'ingestion d'émulsions de cultures.

5° Le bacille aviaire récemment isolé se montre très pathogène pour la poule et le lapin. Inoculé par voie veineuse, il produit chez les animaux une infection à marche aiguë, subaiguë ou chronique. Les lésions anatomiques observées dépendent davantage du temps d'évolution de la maladie que des doses de bacilles inoculés.

6° Les souches aviaires récemment isolées, soumises à l'action prolongée de la bile au moyen de cultures en série sur pomme de terre glycinée et bilée, voient leur virulence progressivement s'atténuer. Le degré d'atténuation de virulence varie avec la souche étudiée.

7° Le bacille aviaire se présente au moment de l'isolement exclusivement sous forme de culture lisse. La variété S porte donc en elle tous les caractères et toutes les propriétés de l'espèce.

Si l'on ne se sert pour les réensemencements que de milieux à l'œuf, glycinés ou non, les cultures du bacille aviaire gardent invariablement leur caractère lisse. Etant donné que le bacille bovin, lui aussi lisse et dysgonique lors de l'isolement, peut se dissocier sur les milieux à l'œuf et donner naissance à des souches d'aspect R identique à celui des bacilles humains, il apparaît que le bacille aviaire diffère bien plus des bacilles des mammifères que les bacilles humain et bovin ne diffèrent entre eux.

8° L'emploi de certains milieux appropriés, tels que la pomme de terre glycinée et le milieu liquide de Sauton, permet d'observer la dissociation du bacille aviaire et l'apparition, à partir des cultures lisses initiales S, de colonies rugueuses R, identiques à celles du type humain. Les milieux à l'œuf sont les plus favorables pour la conservation de la variante S et la pomme de terre glycinée pour la variante R.

9° Les cultures R aviaires, récemment dissociées, sont instables et réversibles *in vitro* et *in vivo*. Ensemencées après dilutions préalables, sur le milieu à l'œuf, ces cultures R ne donnent que des colonies d'aspect S, qui, reportées sur pomme de terre, redonnent des colonies d'aspect R. De même, ces colonies R inoculées à la poule ou au lapin ne donnent lors des premiers passages, par ensemencement des organes, que des cultures d'aspect S.

Les cultures R et S aviaires instables récemment dissociées jouissent d'un même pouvoir pathogène pour la poule et le lapin, par voie intraveineuse.

10° Il peut arriver (3 fois sur 30 souches étudiées) que des passages répétés sur pomme de terre glycinée de variétés R instables, aboutissent à leur stabilisation tant *in vitro* qu'*in*

réa, c'est-à-dire que l'ensemencement de des souches B sur n'importe quel milieu aussi que l'ensemencement des cultures d'animaux inoculés avec elles, ne fournissent invariablement que des cultures B. A ce stade, la dissociation est devenue irréversible; il ne peut plus y avoir retour à la forme S initiale. Mais il existe pareillement des souches S irréversibles ne pouvant se dissocier en B, quels que soient les milieux employés.

11° La virulence des souches S et B stabilisées est variable. Pour l'une des souches étudiées, il y avait perte de la virulence pour la variante B alors que celle de la variante S était conservée. Dans deux autres cas, il y avait virulence identique pour les variantes B et S.

Comme il est démontré que la variante S stabilisée peut également perdre sa virulence, il ressort clairement qu'il n'y a pas de relation entre la virulence d'une souche et l'aspect de sa culture.

12° La dissociation des souches aviaires en variétés S et B entre dans l'ordre général des phénomènes d'adaptation de l'espèce au changement des conditions du milieu. Malgré l'irréversibilité des variantes S et B stabilisées, il n'y a entre elles qu'une différence d'aspect morphologique.

13° La pigmentation des souches aviaires constitue un épiphénomène survenant dans diverses circonstances et s'observant indistinctement pour les variantes S et B. L'apparition du pigment ne modifie en rien les caractères morphologiques et la virulence de ces variantes. Son existence ne suffit donc pas à poser le problème d'une variété autonome nouvelle.

14° Les bactéries aviaires aviculaires stabilisées en S et B qui ont le même aspect de culture que les bactéries issues du cobaye mort et le B₆ peuvent cependant en être distingués par leur morphologie, l'intensité de leur pigmentation, la texture de leur colonie et surtout leur pouvoir pathogène. En effet, alors que, par voie intraveineuse, les bactéries aviaires atténuées produisent chez le lapin des ostéomyélites, les bactéries issues du cobaye mort et le B₆ restent sans effet. Au contraire, par voie sous-cutanée, les bactéries aviaires atténuées ne sont pas pathogènes pour cet animal, alors que les bactéries issues du cobaye provoquent des méningites mortelles.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KOCH (Robert). *Berl. Klin. Woch.*, 1882, p. 229 ; *Mitt. a. d. Kais. Gesund.*, 2, 1884, p. 22.
- [2] NOCARD et ROUX. *Ces Annales*, 2, 1888, p. 24.
- [3] RIVOLTA. *Giornale Anat. Fisiol.*, fasc. 1, 1889.
- [4] MAFFUCCI. *Rif. Medica*, mai 1890.
- [5] KOCH (Robert). *Congrès Intern. de Méd.*, Berlin, 4 août 1890.
- [6] STRAUS et GAMALEIA. *Arch. Méd. Expér. et Anat. Path.*, 3, 1891, p. 457.
- [7] WEBER et BOFINGER. *Tuberk. Arbeiten a. d. K. Gesund.*, 4, 1904, p. 83.
- [8] CADIOT, GILBERT et ROGER. *Congrès pour l'étude de la tuberculose*, Paris, 1891, p. 69.
- [9] KOCH et RABINOWITSCH. *Virchow's Arch.*, 190, 907, p. 246.
- [10] SAENZ (A.). *Bull. Assoc. Diplômés Microb. de la Fac. de Pharmacie de Nancy*, n° 10, mai 1935. SAENZ et COSTIL (L.). *Ces Annales*, 55, 1935, p. 513.
- [11] SAENZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 109, 1932, p. 1115.
- [12] SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *Diagnostic bactériologique de la tuberculose. Monographie de l'Inst. Pasteur*, 1936, Masson et C^{ie} édit.
- [13] SAENZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 127, 1938, p. 269.
- [14] STRAUS. *La tuberculose et son bacille*, Paris, 1895, Rueff et C^{ie} édit., p. 202.
- [15] METCHNIKOFF. *Virch. Arch.*, 113, 1888, p. 63.
- [16] VAN DEINSE et M^{lle} HOOGHIEMSTER. *C. R. Soc. Biol.*, 128, 1938, p. 243.
- [17] RABINOWITSCH. *Deut. Med. Woch.*, 30, 1904, p. 1075.
- [18] BELLER. *Deut. Med. Woch.*, 38, 1911, p. 453 ; *Arch. f. Geflglk*, 6, 1933, p. 97.
- [19] BORNSTEDT et ROHRER. *Zeit. Inf. Krank. Haust.*, 41, 1932, p. 241.
- [20] SAENZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 122, 1936, p. 362.
- [21] GRANCHER et LEDOUX-LEBARD. *Arch. Méd. Expér. et Anat. Pathol.*, 1891, p. 145.
- [22] GRIFFITH. *Royal Commission Tuberc. Final Rep. Append. 5*, 1911, p. 374-386.
- [23] GRIFFITH. *System of Bact.*, 5, 1930, p. 227.
- [24] HARNACH. *Rev. Génér. Méd. Vétér.*, 37, 1928, p. 129.
- [25] WINN et PETROFF. *Journ. Exp. Med.*, 57, 1933, p. 239.
- [26] KAHN (C.) et SCHWARKOFF. *Journ. Bact.*, 25, 1933, p. 157.
- [27] JENSEN (K. A.) et FRIDMODT-MÖLLER. *Acta. Tuberc. Scand.*, 8, 1934, p. 153.
- [28] SAENZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 122, 1936, p. 1231.
- [29] EASTWOOD et GRIFFITH (S.). *Rep. Loc. Govt. Bd. Publ. Hlth.*, n° 91, 1914.
- [30] GRIFFITH (S.). *Journ. Comp. Path.*, 38, 1925, p. 157.
- [31] SAENZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 113, 1937, p. 704.
- [32] STAMATIN et TOMESCU. *C. R. Soc. Biol.*, 127, 1938, p. 1348.
- [33] SAENZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 124, 1937, p. 704.
- [34] BESTA (Bruno). *Zeit. f. Hyg.*, 117, 1935, p. 403.

- [35] SAENZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 186.
- [36] SAENZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 1937, p. 664.
- [37] SAENZ (A.), COSTIL (L.) et SADETTIN. *Ces Annales*, **57**, 1936, p. 254.
- [38] BOQUET (A.) et NINNI. *C. R. Soc. Biol.*, **113**, 1933, p. 1047.
- [39] COURMONT et DOR. *C. R. Soc. Biol.*, **2**, 1890, p. 587 et **3**, 1891, p. 129.
- [40] GRIFFITH (S.). *Tubercle*, 1925, p. 23.
- [41] BOQUET (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 575 ; *ces Annales*, **61**, 1938, p. 479.
- [42] SAENZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938.

L'INFECTION TUBERCULEUSE SPONTANÉE CHEZ LES MAMMIFÈRES SAUVAGES EN CAPTIVITÉ

par Ach. URBAIN.

(Muséum national d'Histoire naturelle.)

Les Mammifères sauvages, dans la nature, ne prennent jamais spontanément la tuberculose. Par contre, en captivité, dans les ménageries, les Parcs zoologiques, au contact du public, ils sont susceptibles de contracter cette maladie avec facilité.

Nous allons décrire successivement, par ordre zoologique, les cas de tuberculose que nous avons pu enregistrer depuis 1931, au Muséum national d'Histoire naturelle, tant à la Ménagerie du Jardin des Plantes qu'au Parc zoologique.

I. — Ordre des Primates.

A. — SOUS-ORDRE DES SIMIENS.

1° Famille des *Anthropoïdés*.

Cette famille renferme les grands singes : gorille (*Gorilla gorilla* [Wyman]), chimpanzé (*Pan satyrus* [L.]), orang-outan (*Pongo pygmaeus* [L.]). Tous sont très sensibles à la tuberculose. Dungern (1), puis Fox (2), en ont donné des relations détaillées.

Nous avons constaté cinq cas de contagion bacillaire chez des chimpanzés et un cas chez un gorille.

Chez quatre chimpanzés ayant succombé à des affections diverses : stomatite gangréneuse, pneumonie, entérite vermi-

(1) *Münch. Med. Woch.*, 53, 1906, p. 6.

(2) *Diseases in captive wild mammals and birds, description, comparison*. Philadelphie, Londres et Chicago, 1923, Lippincot, Cy, édit.

neuse, il fut trouvé à l'autopsie quelques rares tubercules sur le foie et la rate ; toutes ces lésions renfermaient des bacilles acido-résistants.

Le cinquième *chimpanzé* vivait dans une ménagerie foraine, en contact permanent avec le public. Son cadavre nous fut confié pour déterminer la cause de sa mort. Nous avons constaté une tuberculose généralisée ; les poumons étaient farcis de tubercules, ainsi que le foie et la rate ; les ganglions mésentériques étaient hypertrophiés et renfermaient un pus caséeux riche en bacilles de Koch. Ce bacille, étudié, était du type humain.

Le *gorille* était à la Ménagerie du Jardin des Plantes depuis deux ans. Il mourut en quatre jours, des suites d'une contagion pulmonaire d'origine grippale. A l'autopsie, on trouva sur son foie quatre petits nodules blanchâtres et un ganglion mésentérique hypertrophié. Les frottis de ces lésions, après coloration par la méthode de Ziehl, montrèrent des bâcilles acido-résistants. Des cobayes, inoculés avec une émulsion des tubercules du foie, succombèrent à une tuberculose généralisée. Le type du bacille ne fut pas déterminé.

2° Famille des *Hylobatidés*.

C'est dans cette famille que rentrent les gibbons. Fox (3) signale ces animaux comme très sensibles à la tuberculose. Nous avons pu en déceler deux cas, chez des gibbons à favoris blancs (*Hylobates leucogenys* [Ogilby]), originaires de l'Indochine. Le sérum de ces deux animaux avait fourni une réaction de fixation positive, en présence de l'antigène tuberculeux de Besredka. Les deux singes furent aussitôt isolés. Ils succombèrent, quelques semaines plus tard, à une crise suraiguë d'entérite. L'autopsie montra, sur le poumon gauche de l'un d'eux, quelques rares tubercules et, sur le foie de l'autre, quatre petits nodules blanchâtres. Les frottis de ces lésions renfermaient des bacilles acido-résistants.

(3) *Loc. cit.*

3° Famille des Cercopithécidés.

Cette famille comprend tous les singes communs : cynocéphales, cercopithèques divers, etc., d'Afrique ; macaques, semnopithèques, etc., d'Asie. De nombreuses observations de tuberculose ont été données sur ces animaux. C'est ainsi que L. Rabinowitsch (4), au Parc zoologique de Berlin, a pu étudier 45 singes d'espèces variées, morts tuberculeux ; 5 n'avaient que de la tuberculose pulmonaire, 9 de la tuberculose des ganglions et des viscères abdominaux ; 31 avaient à la fois de la tuberculose abdominale et pulmonaire. Au moyen des cultures et de l'inoculation au lapin, l'auteur a pu constater que, sur 27 animaux examinés, 19 étaient infectés par des bacilles de type humain et 3 par des bacilles de type bovin.

Lindemann (5) a donné aussi la relation de 5 cas de tuberculose sur des singes ; 3 fois l'infection était sous la dépendance du type bovin et 2 fois sous celle du type humain.

Southard (6) a signalé chez un macaque (*Macaca irus* F. Cuvier) des lésions tuberculeuses de la colonne vertébrale (mal de Pott). Enfin, Fox (7) relate, dans son *Traité des maladies des Mammifères sauvages et des Oiseaux en captivité*, des cas fréquents de tuberculose sur des singes appartenant à la famille des Cercopithécidés.

Au Parc zoologique du Bois de Vincennes, la présentation des singes, en troupeau compact, sur des rochers où ils sont en contact permanent avec le public, favorise grandement l'infection bacillaire. Dès qu'un sujet est infecté, il ne tarde pas à contaminer ses congénères. Nous avons eu ainsi des épidémies très graves à déplorer chez ces animaux. Voici, depuis février 1932 jusqu'au 1^{er} juin 1938, par espèces, les pertes que nous avons enregistrées par tuberculose :

- 1 mangabey enfumé (*Cercocebus aethiops* Schreber) ;
- 4 cercopithèques grivets (*Cercopithecus aethiops* L.) ;
- 4 cercopithèques patas (*Erythrocebus patas* [Schreber]) ;
- 3 magots (*Macaca sylvanus* [L.]) ;

(4) *Deutsch. Med. Woch.*, **32**, 1906, p. 866.

(5) *Deutsch. Med. Woch.*, **38**, 1912, p. 1921.

(6) *Journ. Med. Research*, **14**, 1903, p. 392.

(7) *Loc. cit.*

- 80 hamadryas (*Papio hamadryas* [L.]) ;
- 75 cynocéphales babouins (*Papio papio* [Desmarest]) ;
- 92 macaques rhésus (*Macaca rhesus* Aud.) ;
- 2 macaques de Buffon (*Macaca irus* F. Cuvier) ;
- 1 macaque bonnet chinois (*Macaca sinica* L.).

Soit, au total, 262 singes ayant présenté à l'autopsie des lésions tuberculeuses.

Dans 60 p. 100 des cas, on notait de la tuberculose généralisée : tous les organes abdominaux et thoraciques étaient farcis de tubercules, à tous les stades.

Dans 25 p. 100 des cas, les lésions se localisaient presque uniquement aux organes de l'appareil digestif. Chez certains singes, on constatait une simple hypertrophie des ganglions mésentériques ; chez d'autres, le foie et la rate étaient atteints et présentaient quelques tubercules. Chez ces derniers animaux, la mort était provoquée par un accident ou par une autre maladie, les lésions ainsi décelées étant uniquement des trouvailles d'autopsie.

Dans 15 p. 100 des autres cas, les lésions tuberculeuses se répartissaient sur les organes les plus divers. C'est ainsi que chez 4 hamadryas, 6 babouins, 10 macaques rhésus, les deux reins présentaient, au sein de leur parenchyme, aussi bien dans la zone corticale que médullaire, de très nombreux tubercules. Dans ces derniers cas, l'urine contenue dans la vessie était riche en bacilles acido-résistants.

1 hamadryas adulte et 2 macaques rhésus jeunes montrèrent des lésions tuberculeuses accusées de la colonne vertébrale (mal de Pott).

Des adénites cervicales ouvertes et dont le pus renfermait de nombreux bacilles tuberculeux ont été trouvées chez 12 babouins et 2 macaques, tous atteints, par ailleurs, de tuberculose généralisée des organes abdominaux et thoraciques.

Dans trois cas (1 hamadryas, 2 macaques), des lésions testiculaires furent notées. Chez deux de ces sujets, les deux organes présentaient des tubercules nombreux dans le parenchyme, sur l'épididyme et le cordon. Chez le troisième, un seul testicule était atteint, avec une lésion ouverte à son extrémité antérieure, laissant écouler un pus séreux, huileux, où existaient de nombreux bacilles.

Enfin, chez un mangabey enfumé (*Cercocebus aethiops* Schreber), nous avons trouvé une lésion tuberculeuse du cerveau. Voici, complète, cette dernière observation, relevée par MM. Riese et Nouvel :

A l'ouverture de la boîte crânienne, le cerveau paraît normal. Ce n'est qu'après l'enlèvement de la pie-mère que l'on voit, à la partie antérieure du lobe occipital gauche, un nodule jaunâtre de la taille d'un pois. Ce nodule occupe l'extrémité médiane du sillon lunatus, juste à l'endroit de l'union de ce dernier avec l'interpariétal et l'incisure pariéto-occipitale ; on a l'impression que l'anomalie s'arrête à l'incisure. Le tissu environnant est, lui aussi, jaunâtre et endurci. Sur une coupe sagittale, on voit que le nodule s'étend dans la profondeur du tissu ; il est pourtant bien délimité. Sa surface est à peu près quadrangulaire, la longueur du côté de ce carré est de 1 centimètre environ. Dans son centre, on remarque une tache foncée. La substance grise de l'écorce qui environne la lésion est en partie aplatie.

Histologiquement (8), on distingue plusieurs tubercules groupés autour de la fissure occipito-pariétale et développés surtout sur le lobe occipital, quoique le bord antérieur de la fissure soit également atteint par la lésion, contrairement à ce que l'on croyait voir macroscopiquement.

Le tissu cérébral est entièrement détruit au niveau de la lésion ; au centre des tubercules, on constate une masse amorphe et caséuse. Ce centre est entouré d'une couche cellulaire constituée par tous les éléments du tissu cérébral ; on y distingue à différents endroits des cellules géantes. On note également une prolifération de certains éléments, particulièrement de la névroglie, du tissu conjonctif et des néo-formations vasculaires. Des bacilles acido-résistants ont pu être décelés au niveau de la lésion.

Une deuxième observation de tuberculose cérébrale a été faite, en 1938, sur un cynocéphale (*Papio papio* [Desm.]) ; la voici résumée :

A l'autopsie, on relève des lésions de tuberculose généralisée s'étendant sur les organes abdominaux, à l'exception de ceux de l'appareil génito-urinaire, et sur les poumons.

A l'ouverture de la boîte crânienne, l'aspect des membranes d'enveloppe est normal.

Après enlèvement de la pie-mère, on observe :

1° Sur l'hémisphère droit : Lobe frontal : dans le triangle formé par le sillon rostral et l'arcuatus, deux petits nodules blancs, saillants, l'un au-dessus de l'autre. Sur une coupe frontale passant au niveau de la

(8) Cette étude histologique a été faite par le Dr Riese, que nous tenons à remercier ici.

limite du premier et du deuxième tiers du triangle décrit, un nodule de 2 millimètres de diamètre occupe la vallée du sillon arcuatus.

2° *Sur l'hémisphère gauche* : A l'extrémité antérieure du sillon calloso-marginal, on remarque une lésion qui se présente sous la forme d'une ligne blanche, parallèle au sillon rostral interne, située au-dessus de celui-ci et partant du sillon calloso-marginal sous un angle de 90°, pour se diriger de haut en bas et d'avant en arrière. Cette lésion s'étend sur une longueur d'environ 1 centimètre.

Sur une coupe sagittale faite dans le plan situé 0 cent. 5 à gauche de la surface médiane de l'hémisphère et parallèlement à celle-ci, on constate que la lésion a la forme d'un petit nodule situé dans la profondeur du sillon accessoire partant du sillon calloso-marginal, et se dirigeant vers le bas. Le nodule semble limité à la substance grise et respecter la substance blanche, mais, au niveau d'une coupe parallèle à la précédente et faite 0 cent. 5 à l'extérieur de celle-ci, la substance blanche présente des lésions entre l'écorce du globe frontal et le noyau caudé. Cette lésion, de 3 à 4 millimètres de long sur 2 millimètres de large, a l'aspect d'une zone irrégulièrement perforée.

Au moyen des cultures et de l'inoculation aux animaux d'expérience, nous avons pu reconnaître que, sur 30 singes examinés, 25 étaient infectés par des bacilles de type humain, 4 par des bacilles de type bovin, 1 par des bacilles de type aviaire (9). Il nous paraît intéressant de donner en détail l'observation de ce dernier cas.

Il s'agit d'un macaque bonnet chinois (*Macaca sinica* L.), de quatre ans environ, entré déjà malade à la Ménagerie du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris, au début de septembre 1932.

Ce singe, isolé dès son arrivée, souffrait de diarrhée accompagnée d'une forte dyspnée, surtout lorsqu'il exécutait des mouvements violents. Il succomba, cachectique, le 24 octobre 1932. L'autopsie, immédiatement pratiquée, fit constater une congestion très intense de tout l'intestin grêle, avec ecchymoses accompagnées de petites ulcérations ; les ganglions mésentériques étaient très volumineux, le poumon droit hépatisé dans la plus grande partie de sa surface avec quelques granulations sur son lobe antérieur. Sur les frottis des poumons et des ganglions mésentériques, on trouvait des bacilles acido-résistants nombreux.

Une partie de ces organes broyés, puis traités par l'acide sulfurique à 45 p. 100, futensemencée après neutralisation par la soude, sur 6 tubes de milieu de Lœwenstein. Treize jours

(9) Un certain nombre de ces déterminations a été fait par MM. Nègre, Boquet et Saenz, de l'Institut Pasteur, que nous sommes heureux de remercier ici.

après, on obtint des microcultures de bacilles de Koch ; les colonies sont devenues visibles sur 3 tubes seulement, après cinquante jours. Réensemencées sur de nouveaux milieux à l'œuf-asparagine, elles ont présenté les caractères typiques du bacille aviaire.

Avec la moitié de l'émulsion des organes broyés, non traitée par l'acide sulfurique et la soude, on a inoculé 2 cobayes par voie sous-cutanée ; ces 2 animaux sont morts de maladie intercurrente respectivement quinze et vingt jours après, sans présenter de lésions tuberculeuses.

Avec la culture reportée sur pomme de terre glycinée et âgée de vingt jours, on a inoculé 4 cobayes par voie sous-cutanée, 2 lapins et 1 poule par voie intra-veineuse. 2 de ces cobayes, qui avaient reçu 1 milligramme, ont été sacrifiés trois mois après. Leur autopsie montra, pour toute lésion, une légère hypertrophie des ganglions inguinaux correspondants. Les 2 autres, morts de maladie intercurrente quarante-cinq et soixante jours après l'inoculation, ne présentèrent aucune lésion suspecte. Des 2 lapins inoculés dans les veines, celui qui avait reçu 0 milligr. 1 est mort cachectique trente-deux jours après. A l'autopsie, on constata une hypertrophie de la rate et du foie, qui étaient parsemés de petits nodules blanchâtres caractéristiques de la tuberculose, type Yersin. Mêmes lésions sur les reins et les poumons. Les frottis de tous ces organes contenaient des bacilles acido-résistants en abondance. Le second lapin, inoculé à 0 milligr. 01, est mort soixante-douze jours après, sans lésions nodulaires sur le foie et la rate, qui étaient cependant un peu hypertrophiés. Mais le poumon était parsemé des mêmes nodules type Yersin que pour le lapin précédent. La poule, qui avait reçu 0 milligr. 1 dans la veine de l'aile, est morte cachectique vingt-six jours après, présentant à l'autopsie la forme septicémique type Yersin, avec énorme hypertrophie du foie et de la rate. Les frottis de ces organes fourmillaient de bacilles. Le sérum de cette poule, recueilli par saignée à la carotide trois jours avant la mort, agglutine la variante S de la souche homologue employée comme antigène et cultivée en milieu de Sauton. Le taux d'agglutination atteignait 1.500. La même épreuve fut négative avec le sérum des poules normales.

L'ensemble de ces recherches montre que le bacille tuberculeux isolé du macaque bonnet chinois présente tous les caractères d'un bacille aviaire typique.

Comment a pu s'effectuer la contamination de cet animal ?

L'enquête à laquelle nous nous sommes livré a révélé que ce singe était nourri avec du lait et des œufs crus. Il paraît donc vraisemblable d'admettre que l'infection fut consécutive à l'ingestion de ces œufs.

4° Famille des Cébides.

Dans cette famille rentrent les singes communs de l'Amérique du Sud : atèles, sajous, etc., que Fox (10) reconnaît très réceptifs au bacille de Koch.

Nous avons pu autopsier un atèle belzébuth (*Ateles belzebuth* E. Geoff.), de la Ménagerie du Jardin des Plantes, atteint de tuberculose généralisée.

Les organes abdominaux : foie, rate, ganglions mésentériques, ainsi que les poumons, présentaient de très nombreux tubercules ; une adénite cervicale, de la grosseur d'une noix, comprimait la trachée ; elle renfermait un pus caséux où les bacilles tuberculeux furent décelés en abondance.

5° Famille des Hapalidés.

Elle renferme les ouistitis à pinceaux, si communs dans toute l'Amérique du Sud.

Notre prédécesseur à la Ménagerie du Jardin des Plantes, M. Mouquet (11), a trouvé à diverses reprises des lésions tuberculeuses, généralisées aux organes abdominaux et thoraciques, sur des ouistitis à pinceaux blancs (*Hapale jacchus* L.) et sur des ouistitis à pinceaux noirs (*Hapale penicillata* [E. Geoff]).

B. — SOUS-ORDRE DES LÉMURIENS.

1° Famille des Lémuridés.

Les *lémurs*, ou *makis*, de Madagascar, peuvent être, d'après Fox (12), assez fréquemment atteints de tuberculose. Elle a été

(10) *Loc. cit.*

(11) Observations inédites.

(12) *Loc. cit.*

signalée chez le lémur vari (*Lemur variegatus* Kerr.), le lémur mongos (*Lemur mongos* L.), le lémur catta (*Lemur catta* L.), le lémur macaco (*Lemur macaco* L.), le lémur à collier (*Lemur collaris* L.) et le chirogale (*Chirogale major* [E. Geoff.]).

Nous avons enregistré un cas de tuberculose chez un lémur mongos ayant succombé à une entérite vermineuse et dont les poumons et les plèvres étaient parsemés de nombreux tubercules. Le bacille étudié fut reconnu être du type humain.

II. — Ordre des Carnivores.

1° Famille des Félidés.

Il existe un certain nombre d'observations de cas de tuberculose chez les grand félins. I. Straus (13) a rapporté l'histoire d'une lionne, âgée de cinq ans, qui mourut dans une ménagerie où elle était depuis trois ans. Son autopsie révéla l'existence d'une tuberculose pulmonaire très accusée.

Fox (14) a constaté six cas de tuberculose chez des Félidés : 1 tigre (*Felis tigris* L.), 1 jaguar (*Felis pardus* L.), 3 chats sauvages (*Felis catus* L.), et un cas d'ostéite hypertrophiante chez un lion (*Felis leo* L.). Pour cet auteur, ces animaux sont très résistants à l'infection, qui est généralement du type fibro-ulcéreux, avec tendance à la calcification des nodules pulmonaires et extra-pulmonaires.

Jensen (15), au Jardin zoologique de Copenhague, a trouvé des lésions tuberculeuses, confirmées par l'examen bactériologique, chez deux lions, un tigre royal, une panthère noire et un jaguar.

Ball et Lombard (16) ont relaté un cas d'ostéo-arthrite hypertrophiante pneumique chez une lionne.

Bergeon (17) a autopsié, à Saïgon, une panthère femelle qui présentait des lésions tuberculeuses du foie et des poumons.

(13) *Arch. de Méd. expér.*, **6**, 1894, p. 645.

(14) *Loc. cit.*

(15) *Deutsch. Zeit. für. Thiermedizin*, **17**, 1891, p. 225.

(16) *Rev. gén. méd. vétér.*, **35**, 1926, p. 417.

(17) *Rev. vétér.*, **61**, 1^{er} février 1909, p. 29.

Enfin, Czempinska-Paszowiczowa (18) a observé une tuberculose pulmonaire avec cavernes chez une femelle de panthère ayant vécu longtemps au Parc zoologique de Varsovie.

Chez un vieux lion provenant d'une ménagerie foraine et qui mourut dès son arrivée au Muséum, j'ai relevé, à l'autopsie, des lésions de tuberculose pulmonaire étendue. Les poumons étaient farcis de petites cavernes entourées de portions hépatisées renfermant du pus riche en bacilles acido-résistants. Les deux plèvres étaient épaissies, adhérentes, et contenaient du liquide séreux.

Le bacille, isolé par culture et étudié à l'Institut Pasteur, fut déterminé comme appartenant au type bovin.

2° Famille des Procyonidés.

Dans cette famille, seul le coati (19) [*Nasua nasica* L.] a été signalé comme susceptible d'être infecté par le bacille de Koch. Fox (20) en a signalé un cas et A. E. Hamerton (21), pendant une période de sept ans, de 1928 à 1934, en a constaté trois cas.

En janvier 1937, nous avons observé un cas de tuberculose chez un coati âgé de cinq ans et en captivité depuis deux ans.

Avant la mort, nous n'avons constaté que deux jours d'anorexie et de constipation totale ; l'abdomen était tendu ; il n'y avait pas d'hyperthermie et on notait une légère accélération de la respiration. A l'autopsie, la cavité et les organes respiratoires ne présentent aucune lésion. Les organes abdominaux, rétractés, sont soudés les uns aux autres en une masse unique, libre de toute adhérence avec les parois ; le foie, les reins et surtout la rate portent des lésions nodulaires caséuses variant de la grosseur d'un grain de mil à celle d'un pois ; les gan-

(18) *Wiadomosci Weterynarski*, **16**, 1937, p. 8.

(19) Le coati (*Nasua nasica* L.), originaire de l'Amérique du Sud, appartient à la famille des Procyonidés. Il se caractérise par un corps allongé, comprimé latéralement, porté par des pattes courtes, vigoureuses, armées de cinq griffes fortes et serrées l'une contre l'autre. Le cou est court, la tête longue et pointue, terminée par un museau nu, mobile comme un groin, d'où le nom d'ours à trompe qu'on lui donne parfois. Les oreilles sont courtes et arrondies, la queue est touffue, presque aussi longue que le corps. La dentition ressemble à celle des rats et la coloration est variable.

(20) *Loc. cit.*

(21) *Proceedings of the Zoological Society of London*, **2**, 1935, p. 453.

glions lombaires, hépatiques et mésentériques sont très hypertrophiés et caséux, quelques-uns sont abcédés ; le pus qu'ils contiennent est crémeux, blanc verdâtre, et fourmille de bacilles acido-résistants (les frottis en montrent de 10 à 20 par champ microscopique). L'estomac et l'intestin ne paraissent pas lésés ; seule la couche séreuse et l'épiploon portent un semis de petits tubercules, dont les plus gros atteignent la taille d'un grain de blé.

Une réaction de fixation du complément, pratiquée en présence d'antigène à l'œuf de Besredka, sur du sang prélevé dans le cœur après la mort, est fortement positive.

Deux cobayes, inoculés sous la peau de la cuisse avec respectivement 0 c. c. 5 et 1 cent. cube du produit de broyage de la rate, fournissent, après trois semaines, une intradermo-réaction à la tuberculine, très fortement positive, et meurent le trentième et le quarante-deuxième jour après l'inoculation, avec les lésions habituelles de tuberculose expérimentale. Le bacille, isolé du cadavre de l'un d'eux, a été identifié au type bovin par le Dr Nègre, de l'Institut Pasteur.

Enfin, des réactions d'oculo, d'intradermo et d'hypodermotuberculation, faites les jours suivants sur un autre coati de même provenance et ayant vécu depuis plus de deux ans avec le sujet infecté sont restées négatives. Ce dernier sujet ne présente aucun signe de maladie.

3° Famille des *Ursidés*.

La tuberculose a été assez rarement constatée chez les ours en captivité. Jensen (22) a cependant pu autopsier six de ces animaux, pensionnaires du Jardin zoologique de Copenhague, présentant des lésions tuberculeuses, confirmées par l'examen bactériologique. H. Fox (23) signale aussi un cas de tuberculose chez un ours, sans autres détails.

Au cours de l'année 1932, il nous a été permis d'en constater un nouveau cas chez un ours des cocotiers (*Ursus malayanus* Raffles). Il s'agit d'un mâle, âgé de quatre ans environ, entré à la Ménagerie du Muséum le 6 novembre 1930. Au début de l'année 1932, il manifesta de l'irrégularité dans son appétit

(22) *Loc. cit.*

(23) *Loc. cit.*

et présenta rapidement un amaigrissement notable, qui ne fit que s'accroître avec le temps. En mai, une diarrhée fut parfois notée, suivie de constipation opiniâtre ; cet ours succomba le 23 janvier 1932.

Au début du mois de mai, on avait pu prélever quelques centimètres cubes de sang à cet animal. L'examen du sérum, pratiqué en présence de l'antigène de Besredka, avait donné une réaction de fixation nettement positive. Ce résultat était donc en faveur d'une infection tuberculeuse ; l'autopsie le confirma entièrement.

L'autopsie fut pratiquée dès la mort.

Le cadavre était dans un état de maigreur extrême. Les seules lésions constatées se localisaient à l'appareil respiratoire. Le poumon droit présentait, sur la plus grande partie de sa surface, de larges zones d'hépatisation, couvertes de nombreuses granulations ; dans le lobe antérieur existait une cavernicule très nette. Un frottis de l'exsudat de cette cavité, examiné après coloration par la méthode de Ziehl, a montré de très rares bacilles acido-résistants.

Une partie de ces lésions, examinées par notre collègue Boquet, de l'Institut Pasteur, a permis d'isoler et d'identifier le bacille tuberculeux en cause, qui était du type humain.

III. — Ordre des Ongulés.

A. — SOUS-ORDRE DES PROBOSCIDIENS.

1^o Famille des *Éléphantidés*.

La tuberculose a été quelquefois signalée chez les éléphants. Fox (24) en a décrit deux cas chez des éléphants d'Asie (*Elephas maximus* L.) (un mâle et une femelle), qui présentaient des lésions étendues fibro-caséuses.

Eber (25) en a relaté trois cas. Damman et Stedefeder (26) ont eu l'occasion d'autopsier un jeune éléphant qui présentait

(24) *Loc. cit.*

(25) EBER, cité par Fox, *loc. cit.* Lubarsh-Ostertarg's Ergebnisse, 18, n° 2, 1917.

(26) *Deutsch. Tier. Woch.*, 17, 1909, p. 345.

des lésions tuberculeuses du poumon et de quelques corps vertébraux.

H. Thieringer (27) a constaté un cas de tuberculose pulmonaire chez un éléphant ; le bacille isolé était du type humain. R. S. Narayama (28) a relevé de la tuberculose généralisée chez un éléphant de soixante-dix ans. Les lésions intéressaient le foie, la rate et les poumons.

Enfin, plus récemment, Baldrey (29) a trouvé, à l'autopsie d'un éléphant d'Asie du Jardin zoologique du Caire, des lésions tuberculeuses étendues des poumons ainsi que sur la rate, les ganglions médiastinaux et mésentériques.

Nous avons eu aussi, récemment, l'occasion d'en déceler un nouveau cas, sur un éléphant d'Afrique (*Elephas africanus* Blum.) de la Ménagerie du Jardin des Plantes. Cet animal était arrivé le 8 septembre 1925 et avait environ deux ans. Il s'était développé normalement et n'avait jamais manifesté de symptôme de maladie sérieuse. Tout au plus avait-on pu noter un léger amaigrissement survenu depuis quelques semaines, lorsque le 5 novembre 1937, au début de l'après-midi, il s'affaissait brusquement dans son parc où il restait étendu inerte sur le sol. Tous les efforts en vue de le relever étant restés vains, il fut placé sur un chariot et rentré dans sa loge où il succombait au cours de la nuit sans avoir fait le moindre mouvement.

L'autopsie, pratiquée aussitôt, permit de faire les constatations suivantes :

Dans la cavité abdominale, les organes ont un aspect normal, seul l'épiploon présente un peu de congestion. Cependant, il existe une importante quantité de liquide clair (50 litres environ), dont le niveau, sur l'animal debout, devait atteindre sensiblement le milieu de la hauteur de l'abdomen.

Dès l'ouverture de la cavité thoracique, il est possible d'observer des lésions importantes.

Tout d'abord, le tissu conjonctif, ordinairement lâche, qui unit les poumons aux côtes, est ici particulièrement dense. Le long des corps vertébraux et au niveau des articulations vertébro-costales, surtout en avant, ce tissu conjonctif prend un aspect lardacé, réalisant ainsi une soudure intime du poumon et de la paroi thoracique. Toutes ces adhé-

(27) *Berl. Tier. Woch.*, 27, 1911, p. 234.

(28) *Veter. Journ.*, 1925, p. 96.

(29) *Journ. Royal Army Veter. Corps*, 1936, p. 252.

rences ayant été assez facilement rompues, les poumons et le cœur sont sortis de la poitrine.

Le cœur ne présente aucune lésion importante et, notamment, aucun épanchement.

Les poumons, par contre, sont le siège de lésions étendues.

Le poumon droit n'est plus qu'une réunion de cavernes pleines de pus : l'une d'elles, renfermant plus de 2 litres, s'allonge tout le long du bord supérieur ; elle est en communication avec d'autres, moins importantes, qui ne laissent entre elles aucune trace de tissu pulmonaire normal. Seules, subsistent çà et là de grosses travées de tissu fibreux sous forme de masses arrondies du volume d'une noix ou d'un œuf de pigeon. La surface interne de ces cavernes est très irrégulière, de couleur jaune verdâtre ; la cavité en est à peu près complètement remplie par du pus épais, crémeux, homogène, avec quelques parties verdâtres.

Le poumon gauche est le siège de lésions importantes qui l'intéressent tout entier ; ce sont d'abord des noyaux purulents allant de la grosseur d'une noisette à celle d'une noix, renfermant du pus analogue à celui que nous venons de décrire ; puis, près du lobe supérieur, un gros îlot de tissu fibreux ayant un aspect grisâtre, sans fonte purulente ; enfin, entre ces lésions, le tissu pulmonaire est violemment congestionné et contient d'innombrables petits grains de pus jaunâtre, bien délimités, de la grosseur d'un grain de mil.

L'examen du pus, après coloration par la méthode de Ziehl, a montré la présence de nombreux bacilles tuberculeux (10 à 15 par champ). L'étude du bacille isolé, effectuée par le Dr Nègre, de l'Institut Pasteur, a permis de le classer dans le type humain.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'un cas de tuberculose ait été constaté sur un éléphant d'Afrique. Il nous a semblé intéressant aussi d'insister tout particulièrement sur le fait qu'un animal ait pu conserver tous les signes apparents d'une bonne santé, appétit, gaité, notamment, tout en présentant de la fonte purulente presque totale d'un poumon et des lésions extrêmement graves et étendues du second, réduisant à bien peu le rôle physiologique de ces organes.

B. — SOUS-ORDRE DES ARTIODACTYLES.

1° Famille des Bovidés.

Cette famille renferme de très nombreuses espèces, réparties en plusieurs sous-familles.

1° Dans celle des *Bovinés*, Fox (30) signale que la tuberculose a été rencontrée chez le bison américain (*Bos bison* [L.]).

En 1938, nous avons pu constater un nouveau cas sur un bison américain femelle, du Parc zoologique du Bois de Vincennes. Cet animal était né dans un parc européen, il était arrivé au Muséum en 1934. Il avait été isolé quinze jours avant sa mort comme fortement suspect. Son appétit était capricieux, sa rumination très irrégulière. Malheureusement, tout examen clinique fut impossible à cause de son indocilité. Aucune capture de l'animal n'avait pu être tentée : l'animal risquant, à cause de sa combativité, de mourir en syncope, accident toujours à craindre chez les animaux sauvages. Le sujet fut simplement installé dans une bonne écurie et isolé de tous ses congénères, pour éviter tout risque de contagion possible.

L'autopsie révéla que l'animal portait un fœtus à une quinzaine de jours du terme. La cavité abdominale ne présentait rien d'anormal. Par contre, la cavité thoracique présentait de grosses lésions. Le poumon droit, seul atteint, était farci de nodules tuberculeux sphériques très nombreux, de la grosseur d'une noisette et d'une consistance ferme. La plèvre avait une forte adhérence au niveau des septième et huitième côtes ; les deux côtes, à cet endroit, présentaient des lésions caractéristiques de la tuberculose végétante, de la grosseur d'une pomme. Les ganglions trachéo-bronchiques accusaient une forte réaction ; l'un d'eux, gros comme une mandarine, contenait du pus. Les frottis de tubercules pulmonaires ou pleuraux et de pus ont montré de nombreux bacilles acido-résistants.

2° Dans la sous-famille des *Antilopinés*, nous avons, en 1938, enregistré un cas de tuberculose sur une antilope cervicapre mâle (*Antilope cervicapra* Pallas). Cet animal, âgé de cinq ans, avait considérablement maigri depuis quelques mois. Il était soumis à un régime spécial : pommes de terre cuites, mélangées avec de la farine d'orge, grains, fourrage à volonté, en vue de le suralimenter pour lui faire reprendre son embonpoint.

Malgré tous les soins dont il était l'objet, il succomba brusquement. A l'autopsie, on trouva une péritonite tuberculeuse généralisée avec un peu d'ascite (1 litre de sérosité rougeâtre) ; quatre ganglions mésentériques étaient très hyper-

trophies et renfermaient du pus verdâtre. Le foie et la rate présentaient quelques gros tubercules.

Les organes thoraciques : poumons, plèvre, péricarde, étaient normaux

Les frottis de pus et ceux des lésions du foie, montrèrent de nombreux bacilles acido-résistants.

3° En 1934, il nous a été permis de constater, dans la sous-famille des *Bubalinés*, de la tuberculose sur un gnou bleu (*Connochoetes taurinus* Burchell).

Il s'agissait d'une femelle âgée de dix ans, provenant du Petit Parc de l'Exposition Coloniale et mise en dépôt à la Ménagerie du Muséum. Cet animal avait considérablement maigri; son appétit était irrégulier, il restait cependant dans un aspect extérieur de bonne santé lorsqu'il succomba subitement.

L'autopsie fut pratiquée dès la mort; le cadavre était dans un état de maigreur avancée.

Les seules lésions constatées se localisaient au poumon; celui-ci présentait, en effet, sur la plus grande partie de sa surface, de larges zones d'hépatisation couvertes de rares granulations. Un frottis de cette hépatisation, examiné après coloration par la méthode de Ziehl, a montré de nombreux bacilles acido-résistants. Une émulsion de la partie hépatisée du poumon finement dilacérée sur du sable et inoculée à deux cobayes a provoqué, en quarante jours, une septicémie tuberculeuse (adénite inguinale, granulations nombreuses sur le foie, la rate et le poumon).

Une partie de ces lésions a fait l'objet d'un examen particulier au Laboratoire du Dr Nègre à l'Institut Pasteur. Les recherches bactériologiques (isolement du bacille tuberculeux sur le milieu de Lœwenstein, identification par inoculation aux animaux de laboratoire) ont montré qu'il s'agissait d'un bacille tuberculeux du type bovin.

4° Enfin, dans la sous-famille des *Tragélaphinés*, nous avons trouvé un cas de tuberculose chez un élan du Cap femelle (*Taurotragus oryx* [Pallas]). Cet animal, mort au mois de septembre 1937, avait présenté, deux mois auparavant, un amaigrissement rapide. Son appétit était irrégulier, de même que sa rumination. Cet animal, de nature très douce, fut examiné avec soin; une oculo-réaction et une intradermo-réaction pratiquées furent sans résultat. La réaction de fixa-

tion pratiquée avec son sérum, en présence d'un antigène tuberculeux, fut, par contre, légèrement positive.

L'autopsie fut pratiquée immédiatement après la mort. Le cadavre était d'une maigreur extrême.

Dans la cavité abdominale, on nota, sur le foie, de petits tubercules blanchâtres de la grosseur d'un petit pois. Un certain nombre de ganglions de l'intestin grêle étaient hypertrophiés et congestionnés.

Dans la cavité thoracique, il existait des lésions beaucoup plus importantes. Les deux poumons étaient aux trois quarts hépatisés et le gauche présentait, à sa base, une caverne contenant 900 cent. cubes de pus crémeux et d'odeur fétide. Le poumon adhérait à la paroi costale, au niveau des sixième et onzième côtes. A cet endroit, des lésions de tuberculose végétante, de la grosseur d'une petite mandarine, se trouvaient en contact avec la colonne vertébrale. Un ganglion trachéo-bronchique, très hypertrophié, cylindrique, avait un diamètre de 15 centimètres. Le péricarde était très congestionné et renfermait une certaine quantité de liquide rosé.

Le pus pulmonaire présentait un très grand nombre de bacilles acido-résistants.

2° Famille des Cervidés.

Il existe quelques relations de tuberculose chez les Cervidés. H. Fox (31) la signale chez le wapiti (*Cervus canadensis* Erxl.) et le cerf cariacou (*Odocoileus americanus* Erxl.).

En 1941, Schultze (32) publie une observation relative à un chevreuil (*Capreolus capreolus* L.) atteint de tuberculose intestinale.

En 1937, J. Schmidt (33) a souligné la fréquence de la tuberculose chez les Cervidés d'Allemagne. Les animaux les plus souvent atteints sont les daims (*Dama dama* L.), et moins fréquemment les cerfs (*Cervus elaphus* L.) et les chevreuils (*Capreolus capreolus* L.). D'après cet auteur, le bacille tuberculeux rencontré chez ces animaux serait du type bovin.

O. Schiel (34) [1937] a décrit un cas de tuberculose chez un cerf (*Cervus elaphus* L.). Le bacille en cause était du type bovin.

(31) *Loc. cit.*

(32) *Berl. tierärztl. Woch.*, 11 mai 1911.

(33) *Berl. tierärztl. Woch.*, 8 janvier 1937, p. 17.

(34) *Berl. tierärztl. Woch.*, 8 janvier 1937, p. 8.

A deux reprises différentes, nous avons eu aussi l'occasion de rencontrer la tuberculose chez un cerf axis (*Cervus axis* Erxl.) et chez un cerf de France (*Cervus elaphus* L.).

Ces animaux avaient réagi positivement à une intradermo-réaction à la tuberculine. Ils avaient été isolés aussitôt. L'autopsie montra dans les deux cas qu'il s'agissait de tuberculose généralisée; tous les organes abdominaux, foie, rate, ganglions mésentériques, ainsi que les poumons et les plèvres étaient farcis de tubercules à tous les stades.

Le bacille en cause, chez ces 2 animaux, fut identifié au bacille bovin.

3° Famille des Tylopodés.

Fox (35) cite des cas de tuberculose chez le chameau de la Bactriane (*Camelus bactrianus* L.) et le lama (*Lama glama* L.).

Lucet (36) a trouvé aussi une pneumonie caséuse d'origine tuberculeuse sur un lama.

Nous avons constaté chez un lama femelle âgé de douze ans, ayant succombé à la suite d'une indigestion par surcharge, des tubercules sur le foie et la rate. Le poumon et les autres organes étaient normaux.

Des frottis de ces tubercules ont montré, après coloration par la méthode de Ziehl des bacilles acido-résistants.

4° Famille des Suidés.

J. Schmidt (37) a rencontré fréquemment la tuberculose chez le sanglier (*Sus scrofa* L.).

Nous ne l'avons jamais trouvée chez les Suidés que nous avons au Muséum.

C. — SOUS-ORDRE DES PÉRISSODACTYLES.

Famille des Tapiridés.

La tuberculose a été assez rarement signalée chez les tapirs de l'Inde et de l'Amérique. A. E. Hamerton (38) en a cepen-

(35) *Loc. cit.*

(36) *Soc. Méd. Vétér. Pratique*, 7 juillet 1909.

(37) *Loc. cit.*

(38) *Proc. Zool. Soc. London*, 2, 1935, p. 453.

dant constaté trois cas en 1928 au Parc zoologique de Londres. Nous avons eu, en 1937, l'occasion d'en relever un cas chez un tapir d'Amérique (*Tapirus terrestris* [L.])

L'animal ayant fait l'objet de cette observation, était une femelle, bien acclimatée, qui l'année précédente avait mis bas un jeune, et qui était à nouveau fécondée. Elle s'était fait remarquer par une toux fréquente, quinteuse et sèche; son appétit restait normal; en particulier, nous n'avions pu observer aucune modification du rythme respiratoire et aucune hyperthermie. Un matin, nous trouvons ce tapir mort.

A l'autopsie, seuls le poumon et les ganglions bronchiques et médiastinaux sont altérés; aucune lésion sur les autres organes; la cavité péritonéale est absolument normale. Le poumon ne s'affaisse pas à l'ouverture de la cavité thoracique, il est compact, grisâtre, et sa surface est soulevée par une multitude de petites saillies, toutes de la même grosseur: celle d'un petit pépin de raisin. Les ganglions bronchiques et médiastinaux sont à divers stades de l'évolution tuberculeuse. A la base des bronches, il y a une grosse masse mi-purulente, mi-caséeuse, entourée d'une coque fibreuse et formée par la confluence de plusieurs ganglions. Cette poche correspond, par un petit orifice, avec une bronche du poumon droit, qui est elle-même à demi pleine de pus. Nous pensons que c'est l'ouverture de cet orifice, au cours de la nuit, qui a provoqué la mort soudaine du tapir.

Des frottis faits avec la paroi de l'abcès ganglionnaire montrent de très nombreux bacilles acido-résistants.

Deux cobayes inoculés respectivement avec 0 c. c. 5 et 1 cent. cube du produit de broyage de cette matière ganglionnaire meurent en soixante-quinze et soixante-dix-sept jours après avoir présenté, trois semaines après leur inoculation, des intradermo-réactions à la tuberculine positive.

A l'autopsie, ils ont les lésions habituelles de la tuberculose expérimentale. Le bacille, isolé du cadavre de l'un des cobayes, a été identifié au type bovin.

Procédés de diagnostic de la tuberculose des Mammifères sauvages en captivité.

Le diagnostic de la tuberculose chez ces animaux peut être effectué comme dans les autres espèces animales, soit par l'emploi de la tuberculine, soit par la réaction de fixation.

1° TUBERCULINE. — La tuberculine peut être utilisée, avec

succès, pour dépister la tuberculose chez la plupart des animaux sauvages en captivité, à l'exception des singes. C'est ainsi que la majorité des *Ongulés* tuberculeux réagissent fort bien aux cuti-intradermo et ophtalmo-réactions tuberculiniques ainsi qu'à l'injection de tuberculine sous la peau. Nous avons enregistré, par exemple, des intradermo-réactions nettement positives chez un cerf axis, un cerf de France, un bison, un lama, reconnus tuberculeux à l'autopsie ; par contre, cette même épreuve a été négative chez un élan du Cap atteint de tuberculose généralisée.

Nous avons soumis aussi, des tapirs du Parc zoologique, ayant été au contact d'un tuberculeux, aux réactions à la tuberculine. Ces réactions ont porté sur :

1° Un tapir d'Amérique mâle adulte ;

2° Un tapir d'Amérique mâle jeune (produit de la femelle autopsiée) ;

3° Un tapir de l'Inde mâle adulte.

Voici les résultats des intradermo-réactions pratiquées sur chaque animal, en deux points différents : à la base de l'oreille et en région périnéale.

		JOURS						
		1	2	3	4	5	6	7
Sujet 1.	Oreille . .	Inj.	—	+	++	++	+	+
	Périnée . .	Id.	—	+	++	++	+	+
Sujet 2.	Oreille . .	Id.	—	—	—	—	—	—
	Périnée . .	Id.	—	—	—	—	—	—
Sujet 3/4 [Tapir de l'Inde].	Oreille . .	Id.	—	+—	+	++	+	+

(1) Ce sujet, moins docile, n'a pu subir qu'une inoculation.

Les réactions de l'ophtalmo-réaction sont comparables.

		JOURS			
		1	2	3	4
Sujet 1. OEil droit	Inj.	—	—	+	++
Sujet 2. OEil droit	Id.	—	—	—	—
Sujet 3. OEil droit	Id.	—	—	++	++

L'injection hypodermique de tuberculine suivie de prise de température n'a pu être pratiquée que sur les sujets 1 et 2. Elle a fourni des résultats concordants avec les deux épreuves précédentes ; quinze jours après les ophtalmo-réactions, ces injections hypodermiques ont provoqué sur l'animal ayant réagi une vive réaction de l'œil droit (C. Guérin et A. Delattre (39).

Ces quelques exemples montrent l'importance de l'emploi de la tuberculine pour déceler l'infection bacillaire chez les Ongulés qui peuplent, en grand nombre, le Parc zoologique.

Chez les singes, la réaction à la tuberculine a fait l'objet de quelques recherches. D'après Ed. Burnet (40) les singes inférieurs tuberculeux : *M. cynomolgus*, *sinicus*, *rhesus*, les cynocéphales, ne réagissent pas aux cuti-intradermo- et ophtalmo-réactions tuberculiniques ; par contre, ces réactions locales seraient très manifestes chez les chimpanzés. Pour Calmette (41) tous les singes tuberculeux réagissent à la tuberculine inoculée sous la peau. Nous avons mis à profit au Parc zoologique du Bois de Vincennes la présence d'un grand nombre de sujets tuberculeux pour rechercher, avec Nouvel, si ces animaux étaient sensibles aux inoculations superficielles ou aux instillations de tuberculine : cuti-, intradermo-, ou ophtalmo-réaction. Nous avons opéré sur 22 macaques rhesus (*Macaca rhesus* Aud.), sur 10 mangabeys enfumés (*Cercocebus aethiops* [Schreber]) et sur 23 cynocéphales (*Papio hamadryas* [L.]), ainsi que sur 5 patas (*Erythrocebus patas* [Schreber]), cliniquement tuberculeux (avec confirmation ultérieure à l'autopsie). Dans tous les cas, ces réactions sont restées négatives.

Chez les singes tuberculeux de la même espèce, l'injection sous-cutanée de tuberculine aux doses de 0,5, 1 ou 1,5 c. c. provoque une réaction dermique passagère de 2° à 2°5.

Celle-ci est fugace et irrégulière, comme l'a déjà constaté Burnet, même avec des doses plus élevées de tuberculine. Elle peut apparaître dès la 5^e, parfois la 7^e heure.

(39) *Bull. Soc. Centr. Méd. Vétér.*, 61, 1907, p. 375.

(40) *C. R. Soc. Biol.*, 73, 1912, p. 248.

(41) *L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et les animaux*, 4^e édition, 1936, revue par A. Boquet et L. Nègre, Masson, éditeur, Paris.

Chez les 3 chimpanzés (*Pan satyrus* [L.]) cliniquement tuberculeux, l'intradermo- et la cuti-réaction ont provoqué une légère réaction œdémateuse, ne présentant aucune différence avec celle qui s'est manifestée sur 3 chimpanzés sains inoculés dans les mêmes conditions.

Par contre, l'injection sous-cutanée de tuberculine chez 2 des animaux tuberculeux, a provoqué une réaction caractéristique : hyperthermie de 1°5 à la 6^e heure, qui s'est maintenue quatre heures dans un cas, trois heures dans l'autre. En résumé, chez les singes tuberculeux des espèces *Macaca rhesus* Aud., *Cercocebus aethiops* Schreber, *Erythrocebus patas* [Schreber], *Papio hamadryas* [L.], les réactions locales à la tuberculine : cuti-, intradermo-, et ophtalmo-réaction restent négatives. L'inoculation sous-cutanée à la tuberculine provoque une réaction fugace et irrégulière chez ces animaux. Par contre, elle est constante chez le chimpanzé (*Pan satyrus* [L.]). Pour ces derniers singes, l'intradermo- et la cuti-réaction, dans les trois cas étudiés, ont fourni un résultat négatif, alors qu'il s'agissait de sujets nettement tuberculeux.

Ces recherches démontrent donc que chez les singes et plus spécialement chez ceux appartenant à la famille des Cercopithecidés la tuberculine est difficilement utilisable pour dépister la tuberculose.

2° RÉACTION DE FIXATION. — 1° *Singes* : L'inconstance de la réaction à la tuberculine chez certaines espèces de singes, la difficulté de les capturer, de les maintenir et d'observer les résultats d'une injection soit dermique, soit sous-cutanée de tuberculine nous a incité à pratiquer la réaction de fixation sur ces animaux.

Nous avons utilisé la technique et l'antigène à l'œuf de Besredka. Dans la majorité des cas le sang a été prélevé à la veine saphène. Le sérum chauffé à 56° pendant trente minutes n'a été trouvé anticomplémentaire qu'exceptionnellement. Avec la collaboration de Nouvel nous avons procédé à l'examen du sérum de 132 singes sains d'espèces différentes, à savoir : 4 magot (*Macaca sylvanus* [L.]), 1 chimpanzé (*Pan satyrus* [L.]), 33 macaques rhésus (*Macaca rhesus* Aud.), 95 cynocéphales (*Papio hamadryas* [L.]) et (*Papio papio* [Desm.]). Dans 132 cas,

la réaction a été négative 129 fois (97,7 p. 100). L'autopsie de ces animaux n'a pas révélé de lésions tuberculeuses.

Nous avons examiné les sérums de 183 singes tuberculeux appartenant aux espèces suivantes : 3 magots (*Macaca sylvanus* [L.]), 2 gibbons indochinois (*Hylobates leucogenys* [Ogilby]), 3 chimpanzés (*Pan satyrus* [L.]), 6 patas (*Erythrocebus patas* [Schreber]), 4 cercopithèques grivets (*Cercopithecus aethiops* L.), 80 macaques rhésus (*Macaca rhesus* Aud.), 83 cynocéphales (*Papio hamadryas* [L.] et *Papio papio* [Desm.]). La réaction a été positive 181 fois (98,9 p. 100). Dans deux cas, il a été enregistré un résultat négatif. Il s'agissait d'un macaque rhésus et d'un cynocéphale babouin, très cachectiques, atteints de tuberculose généralisée et sur le point de mourir. L'autopsie de tous ces singes a montré des lésions tuberculeuses typiques, souvent très étendues et généralisées des organes abdominaux, de la plèvre et des poumons. Le taux des anticorps chez les singes tuberculeux que nous avons examinés a varié de 10 à 100 unités d'anticorps. Dans deux cas, nous avons cependant noté 250 unités. La similitude des résultats fournis par l'anatomie pathologique et ceux de la réaction de fixation donne, chez les singes, à cette épreuve sérologique, une valeur diagnostique des plus importantes.

2° *Autres mammifères sauvages* : Ces animaux, en captivité, sont difficiles à saisir ou à maintenir. Aussi, à la Ménagerie du Jardin des Plantes, et au Parc Zoologique, nous examinons les sérums des animaux suspects de tuberculose en présence de l'antigène à l'œuf au lieu de faire une tuberculation dont le résultat est difficilement contrôlable et nécessite plusieurs captures successives, ce qui ne se fait pas sans risques.

Nous avons pratiqué ainsi l'examen du sérum de divers mammifères (42) :

Deux ours des cocotiers (*Ursus malayanus* Raffles) : deux réactions positives.

Un tapir américain (*Tapirus terrestris* [L.]) : une réaction positive.

Deux cerfs de France (*Cervus elaphus* L.) : deux réactions très positives.

(42) Quelques-uns de ces sérums nous ont été confiés par des vétérinaires parisiens en vue d'éclairer un diagnostic souvent difficile.

Un cerf rusa (*Cervus (Rusa) unicolor* Kerr.) : une réaction positive.

Un gnou bleu (*Connochoetes gnu* Gray) : une réaction légèrement positive.

Un éléphant-d'Asie (*Elephas indicus* L.) : une réaction très positive

Trois lions (*Felis leo* L.) : deux réactions très positives et une légèrement positive.

Soit, sur douze examens, douze réactions (100 p. 100). L'autopsie a toujours confirmé ces résultats. Dans tous les cas, en effet, elle a décelé des lésions tuberculeuses étendues du poumon et souvent des organes abdominaux, qui étaient fréquemment sous la dépendance du bacille du type bovin et plus rarement sous celle du bacille du type humain.

Par contre, les sérums prélevés sur des animaux sains des espèces diverses suivantes : lion (*Felis leo* L.), 3 ; cerf de France (*Cervus elaphus* L.), 4 ; mouflons à manchettes (*Ammotragus lervia*, Pallas), 5 ; ours brun (*Ursus arctos* L.), 1 ; lama (*Lama glama* L.), 4 , ont toujours donné en présence de l'antigène à l'œuf des réactions de fixation négatives (15 examens, 15 résultats négatifs, soit 100 p. 100).

Prophylaxie de la tuberculose des animaux sauvages en captivité.

L'extension que prend la tuberculose dans les Parcs zoologiques, chez divers Mammifères et plus spécialement chez les singes, impose la nécessité absolue d'isoler, dès leur arrivée, les nouveaux pensionnaires de ces établissements.

Au cours de leur quarantaine, ils doivent être soumis à diverses épreuves : tuberculation, recherche de sensibilisatrices tuberculeuses dans leur sérum et ils ne peuvent être mis au contact de leurs congénères que si ces épreuves sont négatives.

Ces mesures s'imposent encore plus strictement si l'on veut soumettre à la vaccination par le BCG les animaux qui peuplent les Ménageries et Jardins zoologiques. Nous avons constaté, à diverses reprises, que dans des lots importants de

singes directement importés de leur pays d'origine : macaques rhésus, d'Asie ; cynocéphales, de Guinée ; hamadryas, d'Abysinie, 4 à 5 p. 100 des sujets s'étaient infectés au cours de leur voyage. Traités par le BCG, ces animaux n'ont pu résister à une infection déjà établie. En effet, cette vaccination ne peut être effectuée, avec succès, que sur des sujets indemnes d'infection bacillaire.

Conclusions.

1° Parmi les Mammifères sauvages détenus en captivité dans les Ménageries et Jardins zoologiques, les singes, quelle que soit leur espèce, sont les plus sensibles à la tuberculose. Après eux, viennent, immédiatement, les ongulés. Parmi ces derniers, les animaux les plus fréquemment atteints sont les cervidés et les bovidés. Un certain nombre de cas de tuberculose ont été aussi signalés chez les grands félidés (lions, panthères, etc.).

2° La répartition des types de bacilles tuberculeux isolés chez les singes est la suivante : sur 30 cas examinés, 25 bacilles de type humain, 4 de type bovin, 1 de type aviaire.

Chez les autres mammifères, le bacille de type bovin est fréquemment rencontré chez les bovidés et cervidés ; le bacille de type humain est trouvé souvent chez les éléphants. Dans les autres espèces de mammifères sauvages on décèle avec la même fréquence, aussi bien le bacille de type humain, que celui de type bovin.

3° La tuberculine est un excellent procédé de diagnostic pour les animaux sauvages de l'ordre des ongulés (bovidés, bubalinés, antilopiné, cervidés, etc.). Par contre, chez les singes, et plus spécialement chez ceux rentrant dans les familles des cercopithécidés : cercopithèques, mangabeys, cynocéphales divers, macaques, etc., la réaction à la tuberculine est inconstante et fugace.

4° La réaction de fixation pratiquée avec un bon antigène tuberculeux paraît être la méthode de choix pour dépister la tuberculose chez les singes ; elle peut être utilisée aussi, avec succès, chez les autres mammifères sauvages.

5° La prophylaxie de la tuberculose des animaux sauvages en captivité ne peut être obtenue que par des mesures sévères : isolement absolu des animaux à leur arrivée, puis tuberculation ou recherches de sensibilisatrices tuberculeuses dans leur sérum. Ils ne doivent être mis au contact de leurs congénères que si ces épreuves sont négatives.

LA MICROBIOLOGIE ŒCOLOGIQUE

SES PRINCIPES — SON PROCÉDÉ (1)

par S. WINOGRADSKY.

« Il me paraît nécessaire de reprendre au point de vue de ces nouvelles idées tout ce qui concerne la nitrification. »

PASTEUR (1862).

La phrase de Pasteur que nous citons en épigraphe sur ce rapport, n'est qu'une remarque en petit texte au bas de la page dans la note des *C. R. Ac. Sc.* sur les *Mycodermes* (1862). Elle nous fait l'effet d'un premier trait de lumière pénétrant dans un domaine obscur. On est donc porté à y voir l'origine lointaine des recherches, dont nous allons rappeler les principales phases de développement. C'est que, malgré son caractère peu affirmatif, elle énonce une suggestion qui amorcera les études sur la nitrification, le phénomène le plus général et le plus caractéristique des milieux naturels ; et ce sont ces études qui ont été le point de départ d'une longue suite de recherches sur la microbiologie du sol et qui en ont établi les premiers fondements.

Aperçu historique.

Comme on le sait, le Maître n'a jamais repris le sujet. Il n'a pas été repris, non plus, dans la maison de Pasteur au cours des longues années qui ont suivi. Cependant, la suggestion n'a pas été perdue, car il n'est guère douteux que les recherches bien connues des éminents agro-chimistes Schloesing et Müntz, ont été inspirées par elle. Leurs travaux ont eu le mérite d'avoir démontré la nature biologique du phénomène brut de la nitrification. Les auteurs ont tenté d'aller plus loin en tâchant de découvrir l'agent spécifique du processus d'oxydation, et ils ont cru l'avoir isolé ; mais la tâche n'était guère

(1) Rapport présenté le 28 octobre 1938 au premier Congrès des Microbiologistes de langue française, à Paris.

réalisable à cette époque, faute de méthode appropriée. Aussi leur ferment nitrique est resté un être plutôt hypothétique, les caractères qu'ils lui attribuent n'ayant aucune ressemblance avec ceux des agents réels du phénomène, découverts plus tard.

En vérité, l'existence d'un agent microbien spécifique ne ressortait nullement des expériences des agro-chimistes français, ce que les critiques n'ont pas manqué de relever ; le seul résultat indéniable du travail était d'avoir établi le fait que ce phénomène d'oxydation est agencé, d'une manière ou d'une autre, par l'activité des organismes.

En laissant donc de côté les données microbiologiques que le travail a apportées (qui ont été jugées positives durant un certain temps), son mérite principal est d'avoir posé nettement un problème agro-biologique de première importance, en appelant ainsi les microbiologistes à l'étudier au moyen de leurs méthodes.

Le même mérite concernant d'autres problèmes agro-biologiques doit être reconnu aux remarquables travaux des chimistes et agro-chimistes français : Boussingault, les Schloesing, père et fils, Müntz, Déhétrain, Maquenne, André et autres.

En 1885-1892, les travaux de Berthelot sur la fixation de l'azote atmosphérique, question encore vierge à cette époque ont attiré l'attention générale, grâce à l'importance du sujet, à l'autorité du grand chimiste, à ses nombreuses notes et mémoires qui se suivaient à une cadence rapide, et à la polémique passionnée avec Schloesing qu'ils provoquaient. Parti d'une idée générale d'une justesse évidente, que la « réserve naturelle des composés azotés tendrait à diminuer s'il n'y avait pas de causes compensatrices »... « il faut donc qu'il existe des actions inverses capables de fixer l'azote », — il commence à attribuer l'action présumée à un facteur physique qui serait l'électricité atmosphérique. Mais dans la suite il paraît s'en désintéresser, au profit d'un autre facteur qui est « l'action sourde et incessante des sols argileux et des organismes qu'ils renferment ». De quels organismes s'agit-il ? Les algues, particulièrement les Diatomées, sont vaguement incriminées. Plus tard, probablement sous l'influence de recherches parues en Allemagne et en Hollande sur la fixation symbiotique

(Hellriegel et Willfart, Beijerinck, 1886-1888), ses idées tendent à se fixer sur les microbes comme agents du phénomène. Pour prouver définitivement leur rôle, il s'adresse à M. Guignard, botaniste, pour lui isoler au moyen de la méthode des plaques de gélatine, quelques colonies bactériennes, dont il se sert pour ses expériences de fixation ; il croit alors pouvoir conclure « qu'il existe des microbes d'espèces fort diverses exempts de chlorophylle et aptes à fixer l'azote, spécialement certaines bactéries du sol » (1).

On appréciera les efforts si persévérants du grand savant pour élucider un problème d'économie mondiale ; on sera tout de même obligé de reconnaître que la méthode pour le faire avancer lui manquait. Les données qu'il apporte, aucun microbiologiste ne saurait les prendre au sérieux, de même qu'il ne reste rien de ses arguments d'ordre analytique après la critique sévère de Schloesing.

Le travail de Schloesing fils et Laurent est, enfin, à mentionner, si remarquable par sa méthode gazométrique, appliquée au phénomène de la fixation, mais qui ne donne aucune réponse à la question de savoir, quels sont ses agents microbiens.

Si les premières recherches sur les plus importants problèmes agro-biologiques ont été exécutées en France par des chimistes assez peu versés dans la technique microbiologique, les rôles apparaissent invertis chez les bactériologistes de l'école de R. Koch en Allemagne : là une technique prestigieuse a été élaborée que l'on connaît, susceptible d'une large application dans toutes les branches de la Microbiologie.

En dehors des questions de pathogénie et d'hygiène on s'est empressé de l'appliquer à l'étude du sol et des eaux, non seulement au point de vue sanitaire, mais encore au point de vue de la densité et de l'activité de leur microflore. De 1886 à 1891 on trouve, principalement dans *Z. f. Hygiene*, plusieurs recherches consacrées à ce sujet (Fränkel, Heraeus, Reimers, Fülles). Leurs données concernant la densité des germes dans le sol sont instructives à rappeler, pour montrer à quelles

(1) Toutes les phrases entre parenthèses sont des citations textuelles.

erreurs peuvent conduire les formules toutes prêtes dans une jeune discipline. Ainsi, Fränkel, qui a paru faire autorité dans la question et qui se servait de tubes roulés (Rollröhrchen), de gélatine nutritive, cite 50.000 germes comme minimum, 950.000 comme maximum par 1 gramme de terre ; d'autres chercheurs trouvent ces chiffres trop bas, leurs maxima ayant atteint 2 à 3 millions. Si l'on pense qu'on compte actuellement au moyen de la méthode microscopique directe les germes par milliards pour un gramme, on aura la mesure de l'efficacité du procédé.

Dans la suite, la gélatine a été remplacée par la gélose, des formules plus avantageuses ont été imaginées, qui ont élevé de plus en plus le chiffre des densités des germes dans le sol. jusqu'à des dizaines et même une centaine de millions ; nombres qui restent tout de même très inférieurs à la réalité.

On reconnaîtra pourtant que la méthode de R. Koch a permis d'isoler rapidement des milieux naturels un grand nombre d'espèces microbiennes ; mais que ces espèces, dociles à la méthode, étaient de celles qui attaquent les matières protéiques ou, en général, l'aliment azoté. Il n'en pouvait être autrement, à cause de la composition du milieu-type que l'on employait : bouillon de viande, gélatine et gélose à bouillon de viande peptoné. En le chargeant de ces aliments substantiels, on croyait le rendre universel, au point que s'il restait stérile, ou peu peuplé, on concluait à l'absence ou à la pénurie des germes.

C'était aller décidément trop loin, en méconnaissant l'existence d'une multitude d'espèces, dont l'œcologie est toute différente, et qui sont de nature réfractaire à ce régime ; c'était aussi ne pas tenir compte des conditions des milieux naturels, qui ne peuvent offrir à leurs populations microbiennes de *bons aliments* mais, comme règle générale, que des substances dégradées.

La multitude de microbes, principalement de bactéries, que la méthode a permis d'isoler ont été différenciés par leurs caractères de culture sur milieux-standard, dans des conditions toutes différentes de celles qui dominent dans les milieux naturels. On les tient pour responsables en bloc des phénomènes généraux — décomposition des matières organiques ternaires

et quaternaires avec dégagement d'acide carbonique et d'ammoniac — dont le sol est le siège.

Passons maintenant à une autre ligne de recherches, qui se sont déroulées parallèlement avec celles que nous avons mentionnées, mais en dehors de toute formule rigide.

En 1887 a paru le travail de S. Winogradsky sur les *Sulfo*-bactéries, un groupe qui habite les eaux chargées d'hydrogène sulfuré, de préférence les sources sulfureuses. Il apparut que leur énergétique ne cadrait avec aucune des notions physiologiques acquises de l'époque. En effet, ces notions ne pouvaient faire prévoir d'aucune manière l'existence de microbes oxydant le H_2S , déposant des gouttelettes de soufre colloïdal dans leurs cellules, puis brûlant le soufre avec dégagement d'acide sulfurique ; le carbone organique ne jouant aucun rôle dans les processus énergétiques de ces *Schwefelbakterien* ou *Sulfobactéries*, qui pullulent de préférence dans les eaux qui en sont dépourvues, ou presque.

Tout aberrant que ce biotype puisse paraître, il y avait des raisons de chercher des cas analogues, quand il s'agissait d'oxydation de corps inorganiques ayant lieu dans des conditions susceptibles d'agencement biologique. Ce fut alors le tour des bactéries des eaux ferrugineuses, les *Leptothrix*, lesquelles absorbent le carbonate de protoxyde de fer, pour l'oxyder en hydrate ferrique qui s'accumule dans les gaines que les filaments secrètent.

Il paraissait ensuite logique de rechercher, si l'agent bactérien encore hypothétique de la nitrification n'appartenait pas à ce type nouveau des *inorgoxydants*. Ce serait là l'explication de l'échec de tant de chercheurs, qui se sont appliqués à l'isoler, sous l'influence du travail de Schloesing et Müntz. On sait que cette idée préconçue s'est pleinement réalisée. Deux groupes d'agents microbiens ont été découverts, l'un présidant à la nitrification de l'ammoniac, l'autre à la nitrification du nitrite formé. Il s'agissait cette fois non d'organismes, dont l'existence est rattachée à des habitats spéciaux, mais d'agents bactériens, dont l'activité s'étend à toute la surface du globe.

Ces microbes, plus facilement maniables, ont permis d'éta-

blir les caractères d'un *nouveau type physiologique* avec toute la précision nécessaire. On s'est assuré que leur nutrition est entièrement inorganique, que la seule source de carbone qu'ils utilisent est l'acide carbonique, assimilé par chimiosynthèse, que les meilleurs aliments organiques n'exercent qu'une action inhibitoire sur leur végétation et sur leur activité, à la manière des antiseptiques. Le type physiologique des *autotrophes*, comme on dit maintenant, a été ainsi constitué, ouvrant un nouveau chapitre de la microbiologie, en même temps que de la physiologie générale.

Le rapporteur a cru devoir rappeler cette suite d'anciens travaux, pour mieux faire ressortir les idées qui les ont inspirés et qui ont joué dans la suite un rôle décisif dans le développement de notre discipline. Ce fut l'idée de la spécialisation des fonctions dans le monde des microbes qui commandait d'éviter les formules générales ; de varier, par contre, largement les conditions du milieu, dans le but de sélectionner les agents spécialisés, par l'effet même d'un milieu propice à l'exercice d'une fonction spéciale. Bref, c'était le *principe de la culture élective*, suivi en fait dès le début, mais nettement formulé en 1895 dans le travail sur « l'Assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes » qui a dirigé ces recherches (*Arch. des Sciences Biologiques de Pétersbourg*, **3**, 1895).

Nous en tirons le passage qui suit : « Comme dans mes recherches antérieures sur les microbes du sol, j'ai eu recours dès le début (de ce travail) à la *méthode de culture élective* (ital. dans l'original) qui m'a rendu plusieurs fois de bons services. Ce terme que j'emploie ici pour la première fois, quelques mots suffiront pour l'expliquer.

« La culture est *élective* quand elle ne présente de conditions favorables qu'à la manifestation d'une fonction déterminée... Plus ces conditions seront étroites, exclusives en quelque sorte, plus l'espèce qui est douée de cette fonction sera favorisée aux dépens de microbes étrangers aux phénomènes auxquels la vie dans ce milieu sera rendue impossible ou du moins très difficile. Ainsi secondé dans la lutte pour l'existence, le microbe spécifique prédominera à tel point dans les cultures, qu'il sera facile de le découvrir, et ensuite de s'en rendre maître » (*loc. cit.*, p. 302).

Rappelons que par ce travail une première espèce microbienne capable de fixer l'azote moléculaire, a été isolée.

Six ans plus tard Beijerinck, dont les recherches sur les bactéries des nodosités des légumineuses ont à cette époque particulièrement attiré l'attention, formule le même principe en termes quelque peu différents : « Dans la phase actuelle du développement de la Microbiologie... les expériences relatives à l'accumulation des microbes ont une importance toute particulière. Elles ont pour but d'isoler et de développer d'un mélange d'organismes les plus divers, les espèces et variétés adaptées à certaines conditions vitales déterminées d'avance. Il se forme ainsi des amas semblables à ceux que la nature présente en quelque sorte elle-même... » (Expérience relative à l'accumulation des bactéries de l'urée. *Arch. Néerl.*, 7, s. 2, 1902. Même travail : *Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. Zentrbl. f. Bakt.*, 7, s. 2, 1901.)

Rappelons qu'à cette époque ce savant a réussi à isoler deux espèces d'*Azotobacter*, dont la fonction fixatrice, non reconnue par lui, a été démontrée par d'autres expérimentateurs et confirmée par lui-même plus tard.

Comme on le voit de ces citations textuelles, le principe de la méthode est identique. Elle ne recommande aucune formule, ce qui serait contraire à son esprit, mais elle indique la voie à suivre pour découvrir les agents microbiens des différents phénomènes dont le sol est le siège. Ce principe s'est montré d'une grande fécondité. L'élan qu'ont pris les recherches sur la microbiologie du sol en témoigne assez clairement. Pour en donner une idée, le rapporteur a cru utile d'ajouter une liste bibliographique d'une partie des travaux qui embrassent la fin du siècle dernier et les vingt années du siècle courant. Sans prétendre épuiser la bibliographie entière de cette branche de microbiologie au cours de l'époque indiquée, cette liste suffit pour illustrer le mouvement de recherches qui a porté principalement sur la nitrification, la fixation d'azote et les autotrophes. On n'y trouve pas les travaux sur la fixation symbiotique, ainsi que sur d'autres sujets, pour ne pas trop allonger la liste. Du reste, les recherches sur les radicales se présentent plutôt en marge du sujet de notre rapport.

Le fait, enfin, mérite l'attention des membres de l'Association que l'on ne trouve dans la liste que très peu de travaux exécutés par des microbiologistes français, qui n'ont pris ainsi aucune part active dans le mouvement de ces recherches.

Critique de la méthode courante.

On comprend que sans le bref aperçu historique, que le rapporteur s'est permis d'introduire dans son rapport, il aurait été difficile de faire le bilan d'une longue période de travail collectif, pour déterminer le point, où il nous a conduit, et surtout pour juger s'il sera possible, en persévérant dans la même direction, d'arriver à une compréhension de l'activité microbienne *dans la nature*, ce qui est, bien entendu, le but que se proposent les recherches de laboratoire.

Aussi importe-t-il de noter, dans l'ordre historique, que l'essor que les recherches en question ont pris, en éveillant les meilleures expériences, s'est ralenti, en quelque sorte, vers la fin de la période indiquée, et que l'enthousiasme des débuts a fait place à quelque désappointement, dont on trouve plusieurs échos dans la littérature de l'époque.

Il n'en pouvait être autrement, car il est clair pour tout esprit critique que ces recherches, exécutées d'après le procédé courant de la Microbiologie générale, n'ont pu nous faire connaître qu'un grand nombre de types microbiens, tels qu'ils se présentent en évoluant en dehors de leur habitat et des conditions habituelles de leur existence. Quelques-uns d'entre eux sortaient des rangs, la méthode élective ayant réussi à les trouver doués d'une activité spécifique, le reste, notamment les microbes des numérations (*total counts*), formant une masse extrêmement nombreuse et assez confuse quant à leur rôle dans les milieux naturels. On a pu douter avec raison que les phénomènes microbiens de nos cultures soient identiques aux activités microbiennes dans la nature, cela au triple point de vue de la composition, du milieu, des conditions de l'ambiance et de l'agent microbien lui-même.

Quant à la composition du milieu nutritif artificiel à base de protides et de glucides, en concentration de l'ordre de

1 à 2 p. 100, il est évident qu'elle n'est guère comparable à celle du milieu sol et eaux, où les bons aliments manquent très généralement, remplacés par des aliments médiocres ou mauvais, encore qu'en concentration très faible.

Encore moins comparables sont les conditions de l'ambiance. Au laboratoire, il y a culture pure, obéissant aux principes immuables de la Microbiologie générale; dans les habitats naturels, par contre, mélange extrêmement complexe d'espèces variées. Il est clair que, dans le premier cas, libre carrière est donnée à toutes les possibilités physiologiques, au gré de l'expérimentateur, qui dispose de moyens pour forcer l'espèce à exercer toutes les *fonctions potentielles* compatibles avec son existence. Protégée de la compétition, elle s'y prêtera plus ou moins facilement selon les cas, et il en résultera une caractéristique plus ou moins *large*, comprenant des fonctions variées. Par contre, il ne saurait être question de *largeur* au sein du milieu naturel, particulièrement le sol, où toutes les activités sont strictement limitées par des compétitions puissantes et variées. Elles le sont d'autant plus que le sol normal est généralement pauvre en aliments organiques, au point qu'une grande partie des microbes qui le peuplent sont voués périodiquement à l'inactivité, d'où ils ne sortent qu'au moment précis où le milieu s'enrichit d'une dose éphémère de matière organique, et c'est alors le plus adapté à l'attaquer qui pullulera à ses dépens. Par conséquent, ce n'est pas la faculté du microbe d'exercer une certaine fonction, dont il est capable en culture pure, mais ce sera la compétition qui décidera de la répartition des rôles et qui réglera les activités de la communauté microbienne. En présence de cette communauté, où toutes les aptitudes sont très probablement représentées, ce ne sera donc qu'une aptitude spéciale, la *fonction de prédilection* qui comptera, et ce n'est que cette fonction qui devra être envisagée comme la *fonction naturelle* de l'espèce au sein de son milieu.

Enfin, la variabilité bien connue des organismes en question ne permet pas d'admettre l'identité des espèces microbiennes domestiquées dans nos laboratoires, nourries au cours de longues années avec des aliments essentiellement différents de ceux qu'elles trouvent dans la nature, et dans une

ambiance artificielle, avec leurs prototypes sauvages. Le fait que les souches cultivées s'en écartent facilement, présentent des variations de formes diverses plus ou moins stables, ou subissent des mutilations, a été si souvent observé qu'il paraît inutile d'y insister.

En résumé, le procédé de la Microbiologie générale a eu le mérite de différencier et d'isoler un nombre très important d'espèces microbiennes peuplant les milieux naturels, d'en découvrir même des types intéressant le plus l'économie du globe, mais ce procédé s'est montré impuissant à explorer les conditions de leur activité dans la nature, c'est-à-dire leur *œcologie*.

Il est vrai que l'œcologie des nitrificateurs, d'autres autotrophes, paraît réduite à la présence de la matière inorganique qu'ils oxydent ; toutefois, même dans ce cas, cette condition principale n'est pas la seule.

Le cas se complique énormément, aussitôt qu'il s'agit des hétérotrophes, où il y a toujours latitude très grande dans le choix des aliments. Dans ce cas, le seul fait d'une pullulation provoquée par certain aliment ne nous renseigne que sur l'une des conditions de leur activité au laboratoire, sans nous dire beaucoup sur leur comportement dans la nature.

L'historique de nos connaissances sur les *Azotobacter*, qui ont attiré tant d'études au cours des trente-cinq ans révolus depuis leur découverte, est particulièrement instructif sous ce rapport. Leur culture, d'après la formule de Beijerinck, était toujours conduite sur mannite ou glucose, choisis évidemment en qualité de *bons aliments*, et l'abondance des cultures paraissait justifier ce choix. Les études de Microbiologie générale se sont tenues fidèlement à cette formule, ce qui ne s'explique que par un manque d'*esprit œcologique*, car il est impossible d'imaginer les *Azotobacter* vivant aux dépens de glucides dans les champs et les eaux. Au moyen d'expériences œcologiques, il a été démontré, en effet, que le biotype *Azotobacter* est adapté à des aliments de constitution simple, tels que les produits les plus banaux d'un grand nombre de fermentations, alcools éthylique et butylique, sels d'acide acétique et butyrique ; que c'est aux dépens de ces substances que les souches d'*Azotobacter* suivent toujours une évolution

normale, tandis que cultivé sur glucides, le biotype subit une sorte de *dégénérescence hypertrophique*, en devenant un mutilat à la suite d'une culture prolongée sur milieu à 2 p. 100 de glucose ou de mannite. (Voir IX^e mémoire des Etudes sur la Microbiologie du Sol. Ces *Annales*, 60, 1938, p. 351-400.)

Principes et procédés de la Microbiologie œcologique.

Dès le début des recherches du rapporteur au laboratoire nouvellement installé de Brie-Comte-Robert (1921), dont la tâche était l'étude du peuplement microbien du sol et de ses activités, la question s'est posée de savoir, si les principes et le procédé de la Microbiologie générale suffisaient pour entreprendre des recherches sur ce sujet. Les considérations qui viennent d'être exposées ont conduit à une réponse négative et à la recherche d'une méthode nouvelle qui fut dénommée *méthode directe*. Ses bases ont été indiquées la première fois dans une conférence faite au Congrès international de la Science du Sol en 1925, à Rome.

Par cette méthode on croyait pouvoir compléter le procédé de la Microbiologie générale, jusqu'à le rendre apte à l'étude des phénomènes microbiens, en quelque sorte, dans leur cadre naturel. Mais on devait compter là avec une idée directrice nouvelle, ou non encore suivie systématiquement, et cette idée imposait un procédé qui ne se conformait pas toujours à celui de la Microbiologie générale. Par conséquent, au lieu de chercher une sorte de compromis entre les deux, il parut plus logique et plus clair de différencier la nouvelle branche sous le nom de *Microbiologie œcologique*, en la dotant d'une méthode propre, indépendante de celle de la branche classique, sauf en ce qui concerne, bien entendu, le mode opératoire commun à toutes les branches de la Science microbiologique en général. Au cours de recherches d'une durée de dix-sept ans, les principes de la jeune branche se sont précisés de plus en plus, et c'est sous leur forme en quelque sorte définitive que le rapporteur croit devoir les présenter à ce Congrès.

Le principe œcologique vient en tête en dominant tout le

procédé. Il implique la recherche des conditions d'existence des microbes dans la nature. La Microbiologie générale croyait pouvoir arriver à connaître ces conditions au moyen de la *culture élective*, ou de la méthode d'enrichissement (Anhäufungsverfahren) d'après la terminologie de Beijerinck. Ce savant a été le plus affirmatif sur ce sujet. Dans le passage cité p. 119 où il définit la méthode, il pense que dans certaines conditions *déterminées d'avance* on a le moyen d'approcher de l'écologie des types que l'on cherche à isoler. En réalité, ces conditions n'étaient *déterminées d'avance* que par les idées que le chercheur se faisait du phénomène, et non au moyen d'expériences exécutées *ad hoc*. L'exemple déjà cité concernant l'*Azotobacter* est particulièrement démonstratif sous ce rapport. En somme, la culture élective ne donnait que le moyen de rattacher certains processus à l'activité d'un type morphologique déterminé, encore que son emploi soit étroitement limité à des cas, où la fonction est bien marquée, présentant un caractère d'exclusivité (nitritation, nitrification, fixation, dégradation de la cellulose fibreuse, etc.). Envers d'autres groupes d'organismes, dont les fonctions sont moins nettement délimitées, la méthode est quasi impuissante à différencier leurs activités.

Pour pouvoir étudier les microbes au laboratoire dans des conditions se rapprochant, autant que possible, de leur existence naturelle, le *procédé* doit répondre aux exigences qui suivent.

1° Se servir pour les expériences de souches tout récemment isolées des milieux naturels, en évitant les souches de collection ;

2° Les cultiver au laboratoire sur des milieux de composition analogue, dans l'essentiel, à celle de leur habitat ;

3° Tâcher de maintenir leur ambiance biologique, c'est-à-dire de les étudier entourées de la microflore intégrale du milieu naturel ;

4° Eviter de les faire passer par des milieux standard de la Microbiologie générale : gélose nutritive, bouillon de viande, pommes de terre, etc., la culture sur ces milieux, auxquels ils ne sont guère adaptés, pouvant provoquer un déséquilibre organique, suivi d'un état de variabilité ;

5° Ne faire de la culture pure que sur un milieu conforme à l'œcologie naturelle de l'espèce, dont le criterium le plus sûr est la stabilité parfaite des caractères morphologiques *évolutifs* de l'espèce.

Une différence essentielle entre la méthode de la Microbiologie générale et celle de la Microbiologie œcologique est encore à noter. La première ne s'intéresse, en somme, qu'aux résultats obtenus en culture pure, seuls acceptés par elle ; tandis que la méthode de la Microbiologie œcologique ne saurait se passer de la *culture spontanée*, caractérisée par le libre développement des germes des milieux naturels, qui n'est limité que par la compétition des formes qui composent leur peuplement. C'est ce genre de cultures qui sert de préférence aux expériences œcologiques, où la culture pure n'est justement d'aucune utilité.

Il va sans dire qu'au point de vue de la morphologie et de la physiologie de l'espèce, la culture pure maintient toute son importance.

On désignera sous le nom de *cultures auxiliaires* celles qui ne sont employées que dans des buts techniques, telles qu'isolement ou maintien de la souche à l'abri des impuretés.

Examinons maintenant les milieux et les procédés de culture qui correspondent aux exigences susdites.

LA TERRE COMME MILIEU DE CULTURE. — On a déjà tenté depuis longtemps de se servir de la terre dans des recherches de microbiologie du sol. Mais le principe immuable de la culture pure la faisait stériliser. Or, la terre stérilisée est bien loin de présenter les conditions de la terre en état naturel. Mais autrement l'emploi d'un milieu déjà peuplé, au point de donner tant de millions de colonies sur les plaques standard, paraissait entièrement impossible. Une méthode moins conventionnelle que celle qui était en usage était pourtant nécessaire pour se faire une idée de la densité réelle des germes au sein du sol et de leurs caractères.

Ce qui importait avant tout, c'était une méthode *d'examen microscopique* du sol, entièrement négligé, jusqu'à la fin de la période de recherches dont s'est occupé notre aperçu. Grâce à l'heureuse idée de J. Conn de se servir exclusivement de

colorants acides pour l'examen microscopique de la terre, il n'a pas été difficile d'en imaginer une, donnant des résultats approximatifs mais suffisants pour avoir une idée du tableau microscopique d'un sol donné.

Comme résultat général de l'examen microscopique de nombreux échantillons, on a constaté que le tableau du peuplement d'une terre en *équilibre biologique*, c'est-à-dire n'ayant reçu récemment aucune fumure, est composé principalement de formes coccoïdes minuscules réunies en petites zoogléées compactes, logées sur des flocons de gel organique.

Mais ce tableau change avec une rapidité impressionnante, aussitôt qu'on incorpore à la terre quelque aliment organique. La *fumure* fait alors surgir des pullulations diverses, dont la nature dépend de la qualité de la substance ajoutée : la peptone éveille la végétation de bacilles filamenteux, le sucre, ou autre aliment ternaire, celle des *Azotobacter* ; ceci dans le cas où la terre est étendue en couche peu profonde et modérément humide ; dans le cas contraire, ce sont les ferments butyriques, les *Clostridium*, qui envahissent le milieu ; une dose minime d'azote combiné présente ou ajoutée à la terre activée à l'effet de provoquer une pullulation bacillaire refoulant l'*Azotobacter*, etc. Ces exemples, les plus caractéristiques, suffisent pour illustrer la manière de se servir de la terre naturelle comme milieu de *culture spontanée*.

Ils conduisent à distinguer deux microflore différentes qui se superposent : l'une végétant dans la terre en équilibre, probablement aux dépens de ce résidu de décompositions diverses que l'on désigne de *matière humique*, c'est la *microflore autochtone* ; l'autre, dont les pullulations surgissent d'une manière quasi explosive aux dépens de la matière organique incorporée à la terre, peut être désignée de *microflore zymogène*. Celle-ci est inactive dans la terre en équilibre, gardant l'état de repos, de spores, qui ne sont pas colorables avec les colorants acides, donc impossibles à découvrir parmi les débris minéraux (2).

(2) Récemment, la tendance à réagir contre les méthodes trop artificielles de la Microbiologie générale a fait naître des procédés divers, imaginés dans le but de pouvoir examiner directement au microscope les végétations microbiennes du sol, et même à l'état vivant. Le principe

En résumé, ce genre de culture se montrera utile pour l'étude des conditions, qui déterminent l'activité des différentes espèces dans le sol et leur rapport mutuel.

Pour la technique de la méthode de la coloration et de la culture dans la terre, voir I^{er} mémoire sur la Microbiologie du Sol, Ces *Annales*, 39, 1925.

LES PLAQUES DE SILICE GÉLATINEUSE. — L'emploi d'un gel minéral chimiquement indifférent est de rigueur dans notre branche. Il ne saurait être remplacé par la gélatine, ni par la gélose, laquelle est attaquable par certaines espèces et contient de faibles quantités d'azote, ce qui rend le milieu moins électif, quand il s'agit de fixation. La technique de la préparation est à consulter dans le I^{er} et le V^e mémoires des études sur la Microbiologie du Sol. Ces *Annales*, 39 et 43.

L'usage en est pratique. Préservée de la dessiccation, la couche de gel se conserve presque indéfiniment. Elle se laisse imprégner facilement par toutes sortes de substances en solution et enduire, *émailler*, par des substances en poudre, telles que les carbonates de chaux, de magnésie, kaolin. Sa stérilisation à l'autoclave est possible, mais elle demande quelques ménagements, ce qui n'est guère gênant, le gel par sa préparation même étant libre de germes, ainsi que stérile par sa nature.

Il est commode de se servir de plaques en boîtes de Pétri de trois dimensions : 20, 10, 5 centimètres de diamètre. Les premières sont chargées de 200 centicubes du mélange gélifiant, les secondes de 40, les troisièmes de 10 centicubes.

Les grandes plaques sont préférables, quand il s'agit d'isoler

est de mettre une lame ou lamelle en contact prolongé avec de la terre (Rossi, Cholodny), pour examiner les empreintes des végétations microbiennes qui y adhèrent ; ou même, d'examiner seulement la surface d'un petit bloc de terre sans déranger sa structure (*in an undisturbed condition*), au moyen d'un microscope spécial qui permet de distinguer des touffes de mucédinées logées dans des petits creux du bloc (Kubiena). Ces artifices ingénieux ne permettent que d'observer, ce qu'on pourrait appeler, des *paysages microbiens*, parfois instructifs, mais il est évident qu'ils ne permettent pas de pousser plus loin les études sur la nature, la densité, l'activité des germes qui peuplent une terre donnée. Pour ces recherches, une homogénéisation parfaite de l'échantillon est, bien entendu, inévitable.

du sol des espèces à fonctions déterminées : nitrificateurs, fixateurs, destructeurs aérobies de la cellulose. Leur emploi, comparé aux anciennes cultures en milieux liquides, dites d'enrichissement ou d'accumulation, présente des avantages incontestables. Tandis que dans ces dernières on aboutit à des mélanges souvent difficiles à dissocier, on a sur les plaques des végétations localisées, faciles à différencier, parfois même pures, ou presque pures d'emblée.

La meilleure manière de les ensemercer est de déposer sur la surface des *grains* minuscules de terre, passée par un tamis de 1 millimètre, que l'on attrape avec le bout d'une baguette étirée en fil et légèrement humectée. Il est pratique de les ranger en lignes régulières à distance de 1 centimètre environ l'un de l'autre, ce qui facilite le repérage. On voit alors les grains s'entourer de colonies caractéristiques, ce qui donne un moyen rapide de déterminer la densité des germes spécifiques dans le milieu d'après le taux des grains fertiles.

La grande surface de la boîte de Petri de 20 centimètres permet d'y placer commodément jusqu'à 300 grains. Ainsi arrangée, la plaque de silico-gel est bien comparable, dans l'essentiel, à la terre comme milieu de culture ; seulement, les grains de terre (laquelle possède normalement une structure granuleuse) y sont espacés, entourés d'espace libre, où peuvent s'étendre les végétations microbiennes. Il en résulte des cultures qu'on peut qualifier de *spontanées*, au même titre que celles du milieu terre, car les unes et les autres proviennent de la même source, la microflore intégrale du milieu.

Ces *cultures spontanées* peuvent être employées pour tous les isollements des espèces du sol, en adaptant la composition du gel aux besoins de l'espèce. Du moment que ces besoins sont connus, la tâche devient facile. L'isolement des *Azotobacter*, des vibrions de la cellulose, des nitrificateurs en donne les meilleurs exemples.

Pour l'*Azotobacter*, le gel privé d'azote combiné, reçoit comme seul aliment (hormis les sels organiques) une faible dose d'alcool éthylique ou butylique, ou d'un sel d'acide acétique, butylique ou benzoïque. (Voir VI^e et IX^e mémoires des Etudes, Ces *Annales*, 48 et 60.)

Pour les vibrions cellulotiques, on applique sur le gel, pourvu d'une dose de nitrate, un rond de papier filtre ; les grains s'y entourent de taches vivement colorées que l'on repique sur un milieu analogue. (Voir IV^e mémoire des Etudes, Ces *Annales*, 43.)

Pour les microbes de la nitratisation, le gel, pourvu de dose de sel ammoniacal, est *émaillé* d'une couche de carbonate de chaux ou de magnésie. Les colonies y apparaissent comme plages de dissolution, entourant les grains. (Voir le VII^e mémoire, Ces *Annales*, 50.)

Pour les microbes de la nitratisation, le gel pourvu de nitrite, est *émaillé* d'une poudre de kaolin médicinal, qui rend les minuscules colonies de la bactérie spécifique mieux visibles. (Voir le VII^e mémoire, Ces *Annales*, 50.)

Hormis ces agents spécialisés, il y a les nombreux microbes des *numérations totales* dont les fonctions se confondent, au point que l'on n'a jamais cherché à les différencier, en les cultivant tous sur le même milieu ou à peu près. Il va sans dire, pourtant, que leur étude œcologique s'impose au même titre que celle des espèces dites spécialisées.

Les *épreuves œcologiques* concernant ce groupe peuvent être conduites, en opérant sensiblement de la même manière que quand il s'agit de *cultures spontanées*.

On imprègne le gel successivement par des substances organiques variées : alcools, acides organiques, saccharides, polysaccharides, corps aminés et amidés, protides, etc. Un lot est pourvu d'azote organique ou minéral ; un autre ne contient que l'aliment ternaire, sans traces d'azote combiné.

On répand uniformément sur la surface une dose déterminée, toujours minime, d'un échantillon de terre soigneusement mélangée, qui contient donc tous les germes de sa microflore sans exclusion. Celle-ci réagira par des végétations microbiennes à l'appât d'une substance énergétique déterminée ; et il est évident que la forme la plus précoce à pulluler, à allure rapide, envahissante, s'imposera à l'observateur comme possédant une aptitude spéciale à attaquer la substance offerte. On pourra ainsi établir sa *fonction de prédilection*, qui compte seule dans le milieu naturel, où le facteur

départageant les rôles est la compétition ; la *fonction de prédilection* équivaudra donc à sa *fonction naturelle*.

Cette méthode, très simple et rapide, donne des résultats assez clairs. L'observation ne dure qu'un jour ou deux, parfois quelques heures seulement. Seules les pullulations les plus précoces intéressent les épreuves ; elles sont toujours homogènes ou presque, de sorte que les caractères morphologiques se laissent saisir sans difficulté. Les pullulations secondaires, qui commencent à s'infiltrer dans les pullulations dominantes indiqueront le moment de terminer l'épreuve.

S'il s'agit de microbes anaérobies les plaques peuvent être tenues à l'abri de l'air.

(Voir pour tous les détails V^e mémoire des Etudes, *Ces Annales*, 48).

Ajoutons que les épreuves de ce genre peuvent servir de point de départ pour des expériences de microbiologie générale, ou de biochimie, s'il s'agit de trouver dans le sol les agents de certaines activités chimiques ; il n'y aura alors qu'à repiquer les végétations dominantes et à les soumettre à une épuration définitive.

Quant au milieu gélosé, plus compact et plus isolant que le gel silicique, il présente des avantages, quand il s'agit d'isoler l'espèce à l'état de pureté complète au moyen de la dispersion des germes sur la plaque. On fait également un usage courant des tubes de gélose inclinée, quand l'espèce se prête bien à ce genre de culture.

La culture en milieu liquide est préférable pour les espèces aquatiques, spécialement celles dont la motilité est un état durable, comme chez l'*Azotobacter agilis* (*Azomonade*). Le milieu liquide aura une composition conforme à l'écologie de l'espèce ; il sera de même composition que la solution dont le gel est imprégné. On évitera, bien entendu, l'emploi de bouillons divers, par lesquels on fait passer les espèces microbiennes dans le but d'établir leur diagnostic différentiel.

BIBLIOGRAPHIE

1887-1920.

Les numéros des volumes se rapportent à *Zentralblatt. f. Bakt.* II, (*Orig. ou ref.*) partout où un autre recueil n'est pas indiqué.

NITRIFICATION ET AUTOTROPHES.

- WINOGRADSKY (S.). 1887. Ueber Schwefelbakterien. *Botan. Ztg.*, 45.
 1888. Ueber Eisenbakterien. *Botan. Ztg.*, 46.
 1888. Zur Morphologie und Physiologie des Schwefelbakterien, p. 1-120, 4 pl., Leipzig.
 1889. Recherches sur les Sulfobactéries. *Ces Annales*, 3.
 1890. Sur les organismes de la nitrification. *C. R. Ac. Sc.*, 110.
 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification I^{er}, II^e et III^e mémoires. *Ces Annales*, 4.
 1891. Sur la formation et l'oxydation des nitrites pendant la nitrification. *C. R. Ac. Sc.*, 113.
 1891. Recherches sur les organismes de la nitrification, IV^e et V^e mémoires. *Ces Annales*, 5.
 1892. Contribution à la morphologie des organismes de la nitrification. *Arch. d. Sc. Biol.*, Petersbourg, 1, p. 40, 5 pl.
 1904. Die Nitrifikation. *Lafar's Handbuch d. Techn. Mycologie*, 3, p. 132-181, 3 pl.
 1896. Zur Mikrobiologie des Nitrifikationsprocesses II.
 1899. L'influence des substances organiques sur le travail des microbes nitrificateurs (en collaboration avec Oméliansky). *Arch. d. Sc. Biol.*, Petersbourg, 7.
 BURRI. 1895. Ueber die Nitrifikation. Sammelreferat, 1.
 BURRI et STUTZER. 1895. Ueber einen auf Nähr-Gelatine gedeihenden nitratbildenden Bacillus, 1.
 BURRI et STUTZER. 1896. Zur Frage der Nitrifikation im Erdboden, 2.
 GODLEWSKI. 1896. Ueber die Nitrifikation des Ammoniaks und die Kohlenstoffquellen bei der Ernährung der Nitrifikationsorganismen, 2.
 STUTZER et HARTLEB. 1897. Der Salpeterpilz, 3.
 RULLMANN. 1897. Ueber ein Nitrosobakterium mit neuer Wuchform, 3.
 STUTZER et HARTLEB. 1897. Bemerkungen zu der Mitteilung von Rullmann, 3.
 GARTNER. 1898. Untersuchungen über den von Stutzer und Hartleb beschriebenen Salpeterpilz, 4.
 FRANKEL. 1898. Ueber den von Stutzer und Hartleb beschriebenen Salpeterpilz, 4.
 WINOGRADSKY und OMÉLIANSKY. 1899. Ueber den Einfluss organischer Substanzen auf die Arbeit der Nitrifizierenden Mikroben, 5.
 OMÉLIANSKY. 1899. Ueber die Nitrifikation des organischen Stickstoffes, 5.
 OMÉLIANSKY. 1899. Ueber die Isolierung der Nitrifikations Mikroben aus dem Erdboden, 5.

- OMÉLIANSKY. 1899. Magnesia-Gipsplatten als neues festes Substrat für die Kultur der nitrifizierenden Organismen, 5.
- BEDDIES. 1899. Nitro-Nitroso-Dünger Bakterien in Dauerform, 5.
- RULLMANN. 1899. Der Einfluss der Laboratoriumluft bei der Züchtung von Nitrobakterien.
- STUTZER et HARTLEB. 1899. Untersuchungen über bei der Bildung von Salpeter beobachteten Mikroorganismen, 5.
- MIGULA. 1900. Beiträge zur Kenntniss der Nitrifikation, 6.
- STUTZER. 1900. Der jetzige Stand der Forschung über die Gestalt der Salpeter bildenden Organismen, 6.
- DEMOUSSY. 1900. Oxydation de l'ammoniac composé par les ferments du sol, 6.
- STUTZER. 1901. Die Organismen der Nitrifikation, 7.
- OMÉLIANSKY. 1902. Kleinere Mitteilungen über die Nitrifikationsmikroben, 8.
- OMÉLIANSKY. 1902. Kleinere Mitteilungen über die Nitrifikationsmikroben, 9.
- OMÉLIANSKY. 1902. Scheiden die Nitritmikroben Oxydase aus, 9.
- SCHULZ-SCHULZENSTEIN. 1903. Ueber die Nitrifikationsorganismen in den Filtern biologischer Kläranlagen, 10.
- ADLER. 1904. Ueber Eisenbakterien in ihrer Beziehung zu natürlichen Eisenwässern, 11.
- SCHORLER. 1904. Beiträge zur Kenntniss der Eisenbakterien, 12.
- BUHLERT. 1904. Die Lebensbedingungen der Salpeterbakterien, 12.
- BERNSTEYN. 1904. Ueber einige in den Kulturen zur Reinzüchtigung des Nitratbildners regelmässig auftretenden Bakterienarten, 12.
- WIMMER. 1904. Ueber Nitrifikation und Denitrifikation der Ackererde, 13.
- NATHANSON. 1904. Ueber eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel, 11.
- SESTINI. 1904. Bildung von Salpetrigen Säure und Nitrifikation als chemischer Process im Erdboden, 13.
- LÖHNIS. 1904. Ueber Nitrifikation und Denitrifikation in der Ackererde, 13.
- BOULANGER et MASSOL. 1903-1904. Etude sur les microbes nitrificateurs. Ces *Annales*, 17 et Ces *Annales*, 18. — Sur l'action des sels ammoniacaux sur la nitrification du nitrite de soude par le ferment nitrique, C. R. Ac. Sc., 1905.
- PEROTTI. 1906. Di una modificazione al metodo di isolamento dei microorganismi della nitrificazione. *Ibid.* Di una forma nitrosante da un terreno di Roma, 16.
- SCHORLER. 1906. Die Rostbildung in Wasserleitungsröhren, 15.
- GUTZEIT. 1906. Einwirkung des Hederichs auf die Ackererde, 16.
- ELLIS. 1907. A Contribution to our Knowledge of the Thread Bacteria, 19.
- OMÉLIANSKY. 1907. Kleinere Mitteilungen über Nitrifikations-Mikroben, 19.
- KASERER. 1908. Ueber einige neue Stickstoffbakterien mit autotropher Lebensweise, 20.
- LESLIE COLEMAN. 1908. Untersuchungen über die Nitrifikation, 20.
- KARPINSKY et NIKLEWSKI. 1908. Ueber den Einfluss organischer Verbindungen auf den Verlauf der Nitrifikation in unreinen Kulturen, 20.

- STEVENS et TEMPLE. 1908. A Convenient Mode of Preparing Silica Jelly, 21.
- STEVENS et TEMPLE. 1908. Studies in Soil Bacteriology, 23.
- MAKRINOFF. 1909. Magnesia-Gipsplatten und Magnesia-Platten mit organischen Substanzen als sehr geeignetes festes Substrat für die Kultur der Nitrifikationsorganismen, 24.
- STEVENS et WITHERS. 1909. Studies in Soil Bacteriology. III, 25.
- NIKLEWSKI. 1910. Ueber die Bedingungen der Nitrifikation in Stallmist, 26.
- ELLIS. 1910. A Contribution to our Knowledge of the Thread Bacteria, 26.
- HEINZE. 1910. Ueber die Bedingungen der Nitrifikation in Stallmist, 26.
- LEBEOFF. 1910. Ueber die Assimilation des Kohlenstoffes bei Wasserstoff oxydierenden Bakterien, 27.
- STEVENS et WITHERS. 1910. Studies in Soil Bacteriology. IV. The inhibition of Nitrification by Organic Matter Compared in Soils and in solution, 26.
- HEINZE. 1910. Ueber die Salpeterbildung im Boden, 26.
- FRANZEN. 1910. Beiträge zur Biochemie der Mikroorganismen. I. Quantitative Bestimmungen zur Salpetervergähung, 27.
- MOLISCH. 1911. Die Eisenbakterien, 29.
- LIESKE. 1911. Beiträge zur Kenntniss der Physiologie von *Spirophyllum ferrugineum*, einem typischen Eisenbakterium, 29.
- TEMPLE. 1912. Why do Some Soils Nitrify Organic Nitrogenous Substances and the Ammonia Salts of Organic Acids Faster than they do Ammonium Sulfate or Ammonium Chloride, 34.
- VOGEL. 1912. Neue Beobachtungen über das Verhalten von Nitrat im Ackerboden, 34.
- MOLISCH. 1912. Neue farblose Schwefelbakterien, 38.
- HENRI SCHWERS. 1912. *Megalothrix discophora*, eine neue Eisenbakterie, 38.
- RUHLMANN. 1912. Ueber Eisenbakterien.
- KEIL. 1913. Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien. *B. z. Biol. d. Pflanzen*, 11.
- ROBERT STEWART. 1913. The Intensity of Nitrification in Acid Soils, 36.
- CHRISTENSEN. 1913. Biologische Untersuchungen von Hoch- und Niederrungstorf, 37.
- LÖHNIS et GREEN. 1913. Methods in Soil Bacteriology. VI. Ammonia nitrification in Soils and Solution, 37.
- MACBETH et SMITH. 1914. The Influence of Irrigation and Crop Production on Nitrification, 40.
- LÖHNIS et GREEN. 1914. Methods in Soil Bacteriology. VII. Ammonification and Nitrification in Soil and in Solution, 40.
- GREEN. 1914. Investigation into the Nitrogen Metabolism of Soil, 41.
- STZEZEWSKI. 1915. Beitrag zur Kenntniss der Schwefelbakterien, 43.
- TEMPLE. 1915. Nitrification in Acid or Non Basic Soil, 45.
- LIESKE. 1920. Zur Ernährungsphysiologie der Eisenbakterien, 49.
- SKENE. 1920. Contribution to the Physiology of the purple Sulphur Bacteria, 49.
- BEIJERINCK. 1917. Ueber das Nitratferment und über physiologische Artbildung, 47.
- FREMLIN. 1917. Further Observations on Nitrosobacteria, 47.

- JOSHI. 1917. A new Nitrite Forming Organism, **47**.
 BARTHEL, CHR. 1920. Beitrag zur Frage der Nitrifikation in der Ackererde, **49**.
 LEMMERMANN et WICHERS. 1920. Ueber den periodischen Einfluss der Jahreszeit auf den Verlauf der Nitrifikation, **50**.
 LIPMAN, BURGESS et KLEIN. 1920. Comparison of the Nitrifying Power of Some Humid and Some Acid Soil, **50**.
 MEYERHOFF. 1916. I. Die Athmung des Nitratbildners. *Pflügers Arch.*, **164**. — II. Beeinflussung der Athmung des Nitratbildners durch chemische Substanzen. *Pflügers Arch.*, **165**. — 1917. III. Die Athmung des Nitritbildners. *Pflügers Arch.*, **166**.

FIXATION DE L'AZOTE.

- WINOGRADSKY (S.). 1893. Sur l'assimilation de l'azote gazeux de l'atmosphère par les microbes. *C. R. Ac. Sc.*, **116**.
 1894. Même titre, **118**.
 1895. Sur l'assimilation de l'azote libre par les microbes. *Arch. d. Sc. Biol.*, **3**, p. 297-352.
 1902. *Clostridium pasteurianum*, Seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment, **9**.
 BELJERINCK und VAN DELDEN. 1902. Ueber die Assimilation des freien Stickstoffes durch Bakterien, **8**.
 GERLACH et VOGEL. 1902. Stickstoffsammelnde Bakterien, **8**.
 SIDA. 1902. Ueber die Assimilation freien Stickstoffes durch Schimmelpilze, **9**.
 FREUDENREICH. 1903. Ueber Stickstoffbindende Bakterien, **10**.
 GERLACH et VOGEL. 1903. Weitere Versuche mit stickstoffbindenden Bakterien, **10**.
 PURIEWITSH. 1903. Ueber die Stickstoffassimilation bei den Schimmelpilzen, **10**.
 BENECKE et KEUTNER. 1903. Ueber die stickstoffbindenden Bakterien aus der Ostsee, **11**.
 JACOBITZ. 1903. Beitrag zur Frage der Stickstoffassimilation durch den *Bac. ellenbachensis* und *Bac. Caron*, **11**.
 REINKE. 1903. Symbiose von *Volvox* und *Azotobacter*, **11**.
 FISCHER. 1904. Ueber Symbiose von *Azotobacter* und *Oscillarien*, **12**.
 KOCH (A.). 1904. Bodenbakterien und Stickstofffrage, **12**.
 KEUTNER. 1904. Ueber das Vorkommen und die Verbreitung stickstoffbindender Bakterien im Meere, **13**.
 FISCHER. 1905. Ein Beitrag zur Kenntniss der Lebensbedingungen von Stickstoffsammelnden Bakterien, **14**.
 VOGEL. 1905. Die Assimilation des freien elementaren Stickstoffes durch Mikroorganismen, **15**.
 LUTZ. 1904. Les microorganismes fixateurs d'azote. *Morphologie et biologie*. Paris, p. 187, 19 fig.
 PRINGSHEI. 1906. Ueber ein Stickstoff assimilierendes *Clostridium*, **16**.
 HASELHOFF et BREDEMANN. 1907. Untersuchungen über anaërobe Stickstoffsammelnde Bakterien, **17**.
 STOKLASA. 1907. Ueber die Chemischen Vorgänge bei der Assimilation des elementaren Stickstoffes durch *Azotobacter*, **17**.

- CHRISTENSEN. 1907. Ueber das Vorkommen und Verbreitung des Azotobacters in verschiedenen Böden, **17**.
- FISCHER. 1907. Ueber Stickstoffbakterien, **18**.
- KEDIN. 1907. Weitere Untersuchungen über stickstoff-bindende Bakterien, **18**.
- LÖHNIS et PILLAI. 1907. Ueber Stickstoff-fixirende Bakterien, **19**.
- Report of the Soil Chemist and Bacteriologist*, 1907, **16**. — Annual Report of the New Jersey State Agricultural Experiment Station. *New Brunswick*. Azotobacter Studien.
- KOCH (A.). 1908. Ernährung der Pflanzen durch frei im Boden lebende stickstoffsammelnde Bakterien, **20**.
- PRINGSHEIM. 1908. Ueber die Verwendbarkeit verschiedener Energiequellen zur Assimilation des Luftstickstoffes und die Verbreitung stickstoffbindender Bakterien in der Erde, **20**.
- TERNETZ. 1908. Ueber die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes durch Pilze, **20**.
- KRAINSKY. 1908. Azotobacter chroococcum und seine Wirkung im Boden, **20**.
- LÖHNIS et PILLAI. 1907. Ueber Stickstoff-fixirende Bakterien, **19**.
- KRZEMENIEWSKI. 1908. Physiologische Untersuchungen über Azotobacter chroococcum, **20**.
- KOCH (A.), LITZENDORF, KRULL et ALVES. 1908. Die Stickstoffanreicherung des Bodens durch freilebende Bakterien und ihre Bedeutung für die Pflanzenernährung, **21**.
- STOKLASA et COL. 1908. Beitrag zur Kenntniss der chemischen Vorgänge der Assimilation des elementaren Stickstoffes durch Azotobacter und Radiobacter, **21**.
- BREDEMANN. 1909. Untersuchungen über die Variation und das Stickstoffbindungsvermögen des Bac. asterosporus, **22**.
- LÖHNIS et WESTERMANN. 1909. Ueber Stickstoff fixirende Bakterien, **22**.
- REMY. 1909. Untersuchungen über die Stickstoffsammlungsvorgänge in ihrer Beziehung zum Bodenkleinwesenleben, **22**.
- BEIJERINCK. 1909. Binding van vrije atmosferische Stickestof door Azotobacter in reincultur, **22**.
- BREDEMANN. 1909. Bacillus amylobacter A. M. und Bredemann, **23**.
- BREDEMANN. 1909. Regeneration der Fähigkeit zur Assimilation von freiem Stickstoff des Bac. amylobacter A. M. und Bredemann und der zu dieser Species gehörenden bisher als Granulobacter, Clostridium usw. bezeichneten anaëroben Bakterien, **23**.
- KRZEMENIEWSKI. 1909. Untersuchungen über Azotobacter chroococcum, **23**.
- PRINGSHEIM. 1909. Ueber Verwendung der Cellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffes, **23**.
- PRINGSHEIM (H.). 1909. Ueber die Identität Stickstoff-bindender Clostridiums, **24**.
- DE KRUYFF. 1910 (Buitenzorg). Quelques remarques sur les microbes aérobies fixant l'azote libre de l'atmosphère dans les tropiques, **26**.
- PRINGSHEIM (H.). 1910. Weiteres über die Verwendung der Cellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffes, **26**.

- PRINGSHEIM Hans und Ernst. 1910. Ueber die Verwendung von Agar als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffes, 26.
- KRAINSKY. 1910. Ueber die Stickstoffanreicherung des Bodens, 26.
- KOCH (A.). 1910. Weitere Untersuchungen über die Stickstoffanreicherung des Bodens durch freilebende Bakterien, 26.
- KOCH (A.). 1910. Ueber Luftstickstoffbindung im Boden mit Hilfe von Cellulose als Energiematerial, 26.
- KAISERER. 1910. Zur Kenntniss des Mineralstickstoffbedarfs von Azotobacter, 28.
- OMELIANSKY et SSEVEROWA. 1911. Die Pigmentbildung in Kulturen des Azotobacter chroococcum, 29.
- NOWACKI. 1911. Zur Stickstofffrage, 30.
- PRINGSHEIM. 1912. Ueber die Assimilation des Luftstickstoffes durch thermophile Bakterien, 31.
- KOCH (A.) et SEYDEL. 1912. Ueber die Verwendung der Cellobiose als Energiequelle bei der Stickstoffbindung durch Azotobacter, 31.
- KOCH (A.) et SEYDEL. 1912. Versuche über den Verlauf der Stickstoffbindung durch Azotobacter, 31.
- VOGEL. 1912. Untersuchungen über das Kalibedürfniss von Azotobacter, 32.
- PRAZMOWSKI. 1912. Die Entwicklungsgeschichte, Morphologie und Cytologie von Azotobacter chroococcum, 33.
- STAHEL. 1912. Stickstoffbindung durch Pilze bei gleichzeitiger Ernährung mit gebundenem Stickstoff, 33.
- ROSING. 1912. Zusammenfassung der Ergebnisse von Untersuchungen über die Stickstoffsammlung von Azotobacter chroococcum, 33.
- SACKETT. 1912. Bakteriologische Untersuchungen über die Stickstoffbindung in gewissen Bodenarten von Colorado, 34.
- ROSENBLATT, LICHTENSTEIN et HANS PRINGSHEIM. 1913. Ueber ein aërobes Stickstoff assimilierendes Clostridium, 36.
- PRAZMOWSKI. 1913. Azotobacter-Studien. II. Physiologie und Biologie, 37.
- DAN JONES. 1913. A Morphological and Cultural Study of some Azotobacter, 38.
- PETERSON et MOHR. 1913. Non Symbiotic Nitrogen Fixation by Organisms in Utah Soil, 38.
- PRINGSHEIM (H.). 1914. Zur Stickstoffassimilation in Gegenwart von Salpeter. VIII Mitteilung, 40.
- LÖHNIS et GREEN. 1914. Ueber die Entstehung und Zersetzung von Humus, sowie über dessen Einwirkung auf die Stickstoffassimilation, 40.
- KELLERMANN et SMITH. 1914. The Absence of Nitrate Formation in Cultures of Azotobacter, 40.
- LINDNER et NAUMANN. 1914. Zur Frage der Assimilation des Luftstickstoffes durch Hefen und Pilze, 40.
- HANZAWA. 1914. Einige Beobachtung über Stickstoffbindung durch Azotobacter in stickstoffarmen und stickstoffreichen Substanzen, 41.
- LÖHNIS et HANZAWA. 1914. Die Stellung von Azotobacter im System, 42.
- LIPMAN et BURGESS. 1915. Studies on Nitrogen Fixation and Azotobacter Forms in Soils of Foreign Countries, 44.

- FISCHER. 1916. Ueber quantitative und qualitative Leistungen stickstoff-sammelnder Bakterien im Wasser und Boden unter Wasserbedeckung, **46**.
- WEIS et BORNEBUSCH. 1917. Ueber das Vorkommen von Azotobacter in dänischen Waldböden, **47**.
- MOLER. 1917. Ein Beitrag zur Kenntniss der Entbindung des durch Azotobacter fixierten Stickstoffes, **47**.
- OMELIANSKY. 1915. Fixation de l'azote atmosphérique par l'action des cultures mixtes. *Arch. Soc. Biol.*, **18**. — 1915. Sur les Azotobacter des sols russes en col. avec Solunskowa. *Arch. Soc. Biol.*, **18**. — 1915. Sur la physiologie et la biologie des bactéries fixant l'azote. I. Azotobacter chroococcum. II. Clostridium pasteurianum. *Arch. Soc. Biol.*, **19**. — 1915. Sur les rapports entre la fixation de l'azote et la dépense en substance organique non azotée chez les bactéries fixant l'azote. *Arch. Soc. Biol.*, **18**. — 1916. Recherches morphologiques et cytologiques sur les bactéries fixant l'azote. *Arch. Soc. Biol.*, **20**. — 1923. Fixation de l'azote atmosphérique par les microbes du sol. *Monographie*, 172 p., 5 pl. Pétersbourg (en russe).
-

ERRATA

Article A. BOQUET, ces *Annales*, **61**, 1938, p. 479.

Page 483, 21^e ligne : au lieu de 1^{er} décembre, lire 12 novembre; 31 ligne : au lieu de 19 décembre, lire 19 novembre. Page 493, 24^e ligne : au lieu de cent dix-huit, lire cent vingt-cinq. Page 494, 31^e ligne : au lieu de 6 janvier, lire 9 janvier. Page 504, 26^e ligne : au lieu de 0 mgr. 5, lire 0 mgr. 05. Page 502 : dans la 2^e colonne du tableau V, les doses de 0,01 et 0,05 doivent être inversées pour les souches 12, 13 et 15.

I^{er} CONGRÈS DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Paris, 27, 28 et 29 octobre 1938.)

Le premier Congrès de l'Association des Microbiologistes de langue française (comprenant la section française de l'Association internationale de Microbiologie) s'est tenu à l'Institut Pasteur de Paris, du 27 au 29 octobre.

Nous en donnons ci-après le compte rendu, en suivant l'ordre des séances et de la présentation des communications.

Le texte des *Rapports* présentés au Congrès a été, préalablement à la réunion, adressé à tous les membres de l'Association. Les quatre rapports sont, en outre, publiés dans ces *Annales*, tome 61, nos 4, 5 et 6.

PREMIÈRE SÉANCE

RAPPORT

LES ANTIGÈNES SOMATIQUES ET FLAGELLAIRES DES BACTÉRIES

par ANDRÉ BOIVIN

avec la collaboration de LYDIA MESROBEANU.

Le texte du rapport est publié dans la brochure adressée aux membres de l'Association et dans les *Annales*, 61, p. 426.

DISCUSSION DU RAPPORT.

M. **Hornus.** L'antigène glucido-lipidique du bacille typhique mérite-t-il vraiment le nom d'endotoxine ? C'est un produit qui est toxique, mais beaucoup moins que la quantité de corps microbiens correspondants. L'antigène glucido-lipidique du bacille *prodigiosus* est presque aussi toxique que celui des paratyphiques B.

Felix et d'autres ont montré le rôle de l'antigène et de l'anticorps O dans la phagocytose du bacille typhique.

Enfin, Grasset, Reilly, ont préparé des extraits totaux susceptibles d'être détoxiqués par le formol tout en conservant en grande partie leur fonction antigénique : ce qui conduit à penser qu'il est, sans doute, un autre constituant de l'endotoxine que l'antigène glucido-lipidique.

Toutes ces raisons font se demander s'il est bien justifié de confondre endotoxine et antigène glucido-lipidique.

M. Grasset. — M. Boivin, dans son rapport (p. 36), indique ce qui suit : Les endotoxines ne se détoxifient pas.

S'il est vrai qu'en faisant agir des concentrations, même assez élevées, de formol sur l'endotoxine du bacille typhique, à l'état purifié, la détoxication n'est que difficilement réalisable et donne lieu à des précipitations, par contre, en utilisant comme antigène des autolysats endotoxiques, obtenus par un procédé d'extraction consistant en congélations répétées à basse température, la détoxication est plus rapide et plus avancée. Enfin, en appliquant à l'endotoxine typhique la technique que nous avons introduite pour la détoxication des venins en anavenins, consistant à opérer la détoxication de ces antigènes au contact de produits d'hydrolyse pepsique — tel que le bouillon Martin — nous avons obtenu une détoxication rapide de l'endotoxine typhique par addition de 5 p. 1.000 de formol et séjour de six semaines à 38°.

Le dérivé antigénique formolé ainsi obtenu a conservé les propriétés antigéniques de l'endotoxine originale, ainsi que nous l'ont montré les résultats d'immunisation expérimentale de la souris, au moyen de l'émulsion originale de bacille typhique, de l'endotoxine typhique extraite de celle-ci et de l'« endo-anatoxine » typhique dérivée de cette dernière. Un degré de protection semblable est observé chez les animaux immunisés avec ces divers antigènes, éprouvés avec des doses mortelles multiples de bacille Vi, tel que Ty 2, par voie intrapéritonéale. Des taux comparables d'agglutinines anti-typhiques, H et O, sont, de même, mis en évidence dans le sang des animaux et des sujets vaccinés comparativement avec l'antigène original constitué par l'émulsion de bacilles typhiques chauffés et avec l'endo-anatoxine typhique formolée.

En ce qui concerne le rôle respectif des antigènes Vi et O du bacille typhique dans l'immunité anti-infectieuse, nos expériences sur l'immunité active au moyen de l'antigène O et de protection passive avec la souche antityphique O nous ont également amené à la conclusion qu'en dehors du rôle de l'antigène O dans les phénomènes d'intoxication et de la production de l'anti-endotoxine spécifique, cet antigène participe également, bien qu'à un degré moindre que l'antigène Vi, à l'élaboration de l'immunité anti-infectieuse à l'égard du bacille typhique virulent Vi.

Enfin, en ce qui concerne la nature de l'antigène Vi, nos expériences (*C. R. Soc. Biol.*, **124**, 1937, p. 331) nous conduisent à l'opinion qu'en dehors du facteur virulence proprement dit, le facteur toxicité joue également un rôle important dans les phénomènes observés. Ces faits tendent à montrer qu'au facteur « virulence » caractérisant, selon Felix, cet antigène Vi, pourrait être plus justement substitué celui de « pouvoir pathogène » résultant de l'action concomitante des deux facteurs toxicité et virulence.

M. **Boivin** répond à M. Hornus que l'antigène glucido-lipidique d'une bactérie à Gram négatif représente bien, du point de vue quantitatif, le constituant essentiel de l'endotoxine de cette bactérie, comme on peut s'en assurer en étudiant comparativement la toxicité des corps bactériens totaux, tués à 55°, et la toxicité de la quantité totale d'antigène glucido-lipidique que renferment ces corps bactériens.

En réponse aux observations de MM. Hornus et Grasset concernant l'action détoxifiante du formol sur les autolysats bactériens, action mise en évidence par M. Grasset et par M. Reilly, M. Boivin fait remarquer ce qui suit :

1° Par contact très prolongé avec du formol à 40°, un antigène glucido-lipidique s'altère peu à peu : un précipité se forme et la toxicité de la préparation s'abaisse. Mais ce qui reste en solution garde, à l'unité de poids, toute la toxicité de l'antigène initial. Il ne se forme pas d'anatoxine soluble. Quant au précipité, il ne semble pas être antigénique.

2° Il reste sans doute, dans les autolysats formolés, de petites quantités d'antigène glucido-lipidique intact, assurant aux préparations de M. Grasset leur évident pouvoir vaccinant.

3° Il ne semble pas possible de titrer, avec quelque certitude, le pouvoir antigénique d'une préparation, par la simple considération du taux d'anticorps dont elle peut provoquer l'apparition chez l'animal. C'est là un point qui a été bien mis en lumière par les recherches de S. Schmidt, de Copenhague, sur la toxine diphtérique modifiée par diverses substances chimiques.

4° L'action fixatrice du formol sur les protéines des autolysats bactériens, en retardant la résorption de ces protéines, peut retarder, par contre-coup, la diffusion des antigènes glucido-lipidiques dans l'organisme.

Quoi qu'il en soit de ces remarques, cela n'enlève rien à l'intérêt pratique des préparations de M. Grasset.

Prof. **J. J. van Loghem**. — J'ai étudié, avec beaucoup de profit, l'admirable exposé du Dr Boivin. Son rapport forme un bel encadrement aux travaux de l'auteur. Si j'ai demandé la parole, c'est pour souligner l'importance des travaux sur la structure anti-

génique des bactéries du point de vue général de la physiologie microbienne.

Comme je l'ai soutenu depuis des années, la variabilité bactérienne n'appartient pas au domaine de l'hérédité, mais elle représente une fonction des bactéries, c'est-à-dire la fonction d'adaptation. De ce point de vue, mes élèves et moi-même avons étudié la variabilité de la structure antigénique. Nous l'avons étudiée chez des microbes plus ou moins commensaux, comme le colibacille, le *B. Proteus*, et chez des microbes plus ou moins parasites, comme les bacilles typhiques, paratyphiques et dysentériques. Nous avons trouvé que la variabilité de la structure antigénique, comprise comme fonction adaptative est en relation inverse du caractère agressif ou parasitaire de l'espèce. En général, on peut dire : plus une espèce est parasitaire, moins sa fonction d'adaptation est développée.

Je serais heureux de connaître les idées du Dr Boivin sur la signification physiologique de la structure antigénique des bactéries et de savoir s'il est d'accord avec moi pour estimer que la variabilité de cette structure appartient au domaine de la physiologie générale des bactéries. spécialement au chapitre de la fonction d'adaptation.

M. Boivin est bien convaincu que les variations de structure antigénique des bactéries (passage de la forme smooth à la forme rough, passage de la phase spécifique à la phase non spécifique, etc.) se distinguent nettement des phénomènes de mutation, au sens que les généticiens donnent à ce terme. Les variantes antigéniques ne représentent que divers états possibles d'une même espèce bactérienne et les limites de la variation antigénique comptent au nombre des caractères spécifiques de la bactérie.

En ce qui concerne la signification des antigènes pour les bactéries elles-mêmes et indépendamment de tout rapport avec un organisme infecté (question posée par M. van Loghem), M. Boivin rappelle qu'il a pu, en collaboration avec M^{me} Mesrobianu, cultiver le bacille d'Aertrycke en lui fournissant son propre antigène glucido-lipidique comme unique aliment plastique et énergétique. Les antigènes glucido-lipidiques, qui se rencontrent aussi bien chez des purs saprophytes que chez des bactéries pathogènes, peuvent donc représenter une matière de réserve. Il existe du reste, chez les bactéries, des enzymes capables de décomposer ces antigènes.

Prof. Bordet. — Les travaux relatifs à l'antigène O ont beaucoup contribué au progrès de nos connaissances concernant la virulence, surtout depuis que Boivin et ses collaborateurs ont précisé la nature chimique de cet antigène et montré qu'il est doué de qualités endotoxiques.

On ne doit cependant pas perdre de vue que, bien souvent,

plusieurs propriétés microbiennes s'associent pour constituer le substrat de la virulence, et que ces qualités ne sont pas nécessairement les mêmes chez des espèces différentes. Par exemple, chez le colibacille, dont le type S est virulent, tandis que le type R ne l'est pas, on constate que R est très sensible au pouvoir bactéricide de l'alexine, tandis que S est très résistant (Bordet et Renaux). Cette tolérance de S pour l'alexine est sûrement un facteur essentiel de sa virulence.

On sait depuis longtemps que le microbe du charbon doit, pour une bonne part, sa virulence à sa capsule. Mais celle-ci ne suffit pas. On peut obtenir des races qui, introduites dans le péritoine de cobaye, y poussent pendant quelque temps en s'entourant de belles capsules ; mais, bientôt, les microbes sont lysés à l'intérieur même de leur capsule par les principes bactéricides de l'exsudat et l'animal survit (Robyn). La virulence exige donc à la fois la qualité capsulogène et la résistance à l'influence lytique. Mais un autre facteur important de la virulence est le pouvoir de provoquer l'œdème. Ces principes œdématisants ont une valeur immunisante très nette. Néanmoins, on peut obtenir des races fortement œdématisantes et qui ne sont pas virulentes (Stamatin). Le substrat de la virulence est sûrement fort complexe.

M. **Boivin** est pleinement d'accord avec le professeur Bordet pour penser qu'on ne saurait ramener tout le problème de la virulence bactérienne à une question d'antigène O et tout le problème de l'immunité anti-bactérienne à une question d'anticorps O. Antigène H et anticorps H — pour ne parler que des choses bien connues — peuvent également jouer un rôle, au moins dans certaines circonstances, comme il y a été fait allusion dans le rapport. D'autre part, il est bien évident que des bactéries productrices d'exotoxines puissantes, comme le bacille diphtérique et le bacille tétanique, doivent à ces exotoxines l'essentiel de leur pouvoir pathogénique, pendant que la défense spécifique des organismes immunisés repose, au premier chef, sur l'intervention des antitoxines correspondantes.

COMMUNICATIONS

**ÉTUDE DES EXTRAITS TOXIQUES DE STREPTOCOQUES
EN SÉRUM ANIMAL**

par L. COTONI et J. POCHON.

On peut obtenir (J. Weld, R. Hare, nous-mêmes), à partir des corps microbiens streptococciques cultivés dans le milieu anaérobie de Weld, séparés des liquides de culture, et agités avec un sérum animal inactivé, un poison, qui tue la Souris et le Lapin exclusivement par voie veineuse. Ce poison a été rencontré en particulier chez des échantillons de Streptocoque hémolytique d'origine humaine, sans d'ailleurs qu'on puisse établir de relation proportionnelle entre la toxicité de l'extrait d'une part, et le pouvoir hémolytique ou le pouvoir pathogène, d'autre part, des Streptocoques utilisés. Les propriétés de ce poison le rapprochent étroitement de l'hémolysine streptococcique, telle qu'elle a été étudiée dans les milieux liquides additionnés de sérosités, par de nombreux auteurs. On serait tenté de les identifier purement et simplement : mêmes propriétés hémolytiques *in vitro*, lésions analogues produites chez les animaux, filtrabilité, conservation difficile et fragilité au chauffage, altérations par changements d'acidité et d'alcalinité, absence de pouvoir antigène chez les animaux. Mais peut-être ce poison est-il distinct de l'hémolysine proprement dite, puisque l'on constate chez certains Streptocoques l'existence du pouvoir hémolytique et l'absence de toxicité.

**ACTIVITÉ TUBERCULINIQUE
DES CONSTITUANTS ORGANIQUES
DES BACILLES TUBERCULEUX**

par A. BOQUET et G. SANDOR.

Des expériences effectuées sur le cobaye ont permis d'établir une distinction nette entre la sensibilité du type tuberculinique et la sensibilité anaphylactique à l'égard des protéides du bacille de Koch. Les recherches bio-chimiques confirment et précisent cette distinction. Nous avons constaté, en effet, qu'il est facile d'obtenir

des préparations exemptes de protéides, mais douées néanmoins de propriétés tuberculiniques. Par exemple, si l'on précipite par l'acide trichloracétique des bacilles tuberculeux de cultures en milieu synthétique filtrées, les filtrats conservent une partie de leurs propriétés réactionnelles. En général, lorsqu'il s'agit de cultures relativement jeunes (cultures de cinq à sept semaines), le précipité fourni par l'acide trichloracétique entraîne environ 30 à 50 p. 100 de l'activité tuberculinique totale des filtrats ; dans les mêmes conditions, l'acide phosphotungstique en milieu sulfurique se montre beaucoup plus efficace encore, car il précipite la totalité des substances actives. Mais, si l'on opère avec des cultures plus âgées, la précipitation des substances tuberculiniques par l'acide phosphotungstique reste incomplète, bien que les protéides et les protéoses soient entièrement précipités par ce réactif.

Les essais de dialyse donnent des résultats analogues : imperméables aux protéides, les dialyseurs habituels sont traversés par les substances réactionnelles, qu'il s'agisse de filtrats de culture chauffés ou non chauffés, ou de solutions des substances précipitées de ces filtrats par le sulfate d'ammonium à saturation. Pour empêcher la dialyse des produits tuberculiniques, il est nécessaire d'employer des dialyseurs spéciaux qui retiennent également les substances dont la molécule est plus petite que celle des protéides (F. Seibert).

Enfin, nous avons observé qu'une certaine proportion de la tuberculine contenue dans les corps bacillaires contracte des relations physico-chimiques avec des substances lipoidiques. On arrive à rompre cette liaison par des fractionnements convenables, mais, au contraire de ce que l'on constate pour la tuberculine des filtrats de culture, la tuberculine de la fraction non lipoidique n'est pas précipitable par l'acide phosphotungstique en milieu sulfurique.

L'activité tuberculinique des protéides bacillaires se montre très stable et bien définie : quelles que soient les méthodes de préparation et de fractionnement employées, elle est toujours sensiblement la même pour l'unité de poids d'azote protéidique. Cette constatation s'applique aussi bien aux tuberculines des bacilles du type humain qu'aux tuberculines des bacilles du type bovin. Mais l'activité tuberculinique des protéides bacillaires est plus stable que leur structure physico-chimique. Ainsi il n'y a aucune relation entre la dénaturation des protéides et leur activité tuberculinique. Pourtant, la dénaturation doit être considérée comme traduisant l'effondrement de la structure physico-chimique originelle des protéides, structure qui les distingue, en particulier, de celle d'un mélange quelconque de polypeptides. Or, le protéide tuberculinique dénaturé est tout aussi actif, sinon plus actif, que le protéide normal.

Le signe le plus caractéristique d'une dénaturation d'un protéide est la diminution de sa solubilité. Ainsi le protéide bacillaire que l'on précipite à partir des milieux de culture par l'acide trichloracétique est fortement dénaturé puisqu'il ne donne, même dans la soude diluée, que des solutions fortement opalescentes qui déposent d'ailleurs abondamment en quelques jours. Néanmoins, ce protéide dénaturé est aussi actif du point de vue tuberculinique, ou même plus actif que le protéide précipité par le sulfate d'ammonium, lequel est très soluble.

La coagulation seule paraît abolir l'activité tuberculinique des protéides, mais il s'agit ici manifestement d'une insolubilisation totale. D'ailleurs, les lavages à l'eau du coagulum continuent à entraîner pendant très longtemps des substances actives, ce qui tend à montrer qu'il s'agit d'un emprisonnement physique de la substance active dans le coagulum protéidique.

On n'a pas réussi, jusqu'à présent, à obtenir des protéides bacillaires dépourvus d'activité tuberculinique, mais il semble, au contraire, que leurs propriétés réactionnelles à l'égard des cobayes tuberculeux et leurs propriétés déchainantes d'ordre anaphylactique puissent être dissociées au moins partiellement. En effet, l'acétylation par le cétène des fonctions amines primaires de ces protéides paraît diminuer leur capacité de produire une réaction anaphylactique du derme chez les animaux préparés, mais elle n'affaiblit pas leur activité tuberculinique.

En résumé, s'il n'est pas encore permis d'affirmer que la tuberculine est un polypeptide (attaché aux protéides ou libre) ou une substance de nature chimique particulière, on peut considérer comme acquis qu'elle n'est pas le protéide bacillaire proprement dit.

STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DES BACILLES TUBERCULEUX

par G. SANDOR et W. SCHAEFER.

Nous avons réussi à déceler dans le sérum de certains animaux préparés par des injections de bacilles bovins dysgoniques tués, un anticorps qui fixe le complément et précipite spécifiquement les protéides du bacille de Koch. Cet anticorps peut être séparé des anticorps anti-lipoidiques et anti-polyosidiques également présents dans ces sérums.

MODIFICATION DES ANTICORPS ANTIPNEUMOCOCCIQUES SOUS L'ACTION DE LA PEPSINE

par PIERRE GRABAR.

On admet actuellement que les anticorps sont des globulines particulières, qui possèdent des groupements caractéristiques réagissant spécifiquement avec les antigènes ou haptènes correspondants. L'étude chimique de ces groupements est difficile parce qu'ils sont relativement peu stables et, surtout parce que les molécules protéidiques dont ils font partie sont complexes. Il serait donc intéressant d'obtenir des composés de structure aussi simple que possible sans altérer leur activité immunologique. Parmi les procédés que l'on pourrait envisager pour atteindre ce but, l'attaque par des enzymes protidolytiques semble présenter certains avantages. Bien que de nombreux auteurs aient démontré que ces enzymes, employées dans des conditions habituelles, détruisent les anticorps, Parfentjev a réussi à purifier l'antitoxine diphtérique en utilisant la pepsine dans des conditions spéciales (1).

Dans leur étude quantitative de la réaction de floculation de Ramon avec la toxine diphtérique comme antigène, Pappenheimer et Robinson (2) ont constaté que le rapport $\frac{N}{N}$ de l'antitoxine de la toxine au point de floculation est de 3,3-3,5 pour divers sérums et antitoxines concentrées, tandis qu'il n'est que de 2,5 pour l'antitoxine purifiée par le procédé de Parfentjev, ce qui prouve que l'antitoxine a été modifiée par la pepsine.

Poursuivant des études sur les anticorps antipneumococciques nous avons recherché si une modification analogue peut être observée avec ces anticorps. Des expériences préliminaires nous ont montré que les conditions les plus favorables pour cette étude sont les suivantes : pH environ 4,5, basse température (glacière) et concentration assez forte de pepsine (environ 5 milligrammes d'N de pepsine pour 100 milligrammes d'N protéidique). Une solution d'anticorps antipneumococciques type I et II, préparée par la méthode de Felton en partant d'un sérum de cheval immunisé contre ces germes, a été soumise à l'action d'une solu-

(1) U. S. PATENT, n° 2065196. POPE vient de publier (*Brit. J. Exp. Path.*, **19**, 1938, p. 245) un travail où il indique aussi que l'antitoxine peut être purifiée par l'emploi de pepsine.

(2) A. M. PAPPENHEIMER et E. S. ROBINSON. *Journ. of Immunol.*, **32**, 1937, p. 291.

TABLEAU.

A	B	C
<i>Polysaccharide employé pour la précipitation (SI), en milligramme :</i>		
0,025 0,05 0,075 0,1 0,01 0,02 0,04 0,08 0,01 0,02 0,04 0,08		
<i>Azote des anticorps dans le précipité spécifique, en milligramme :</i>		
0,239 0,402 0,535 0,620 0,056 0,098 0,168 0,282 0,406 0,478 0,284 0,363		
<i>Rapports R :</i>		
9,6 8,0 7,1 Excès SI. 5,6 4,9 4,2 Excès SI. 10,6 9,0 7,1 Excès SI.		
<i>Azote des protéides totaux, en milligrammes pour 100 cent. cubes de solution :</i>		
118	89	
A, solution d'anticorps + pepsine avant la digestion; B, même solution après cinq jours de digestion; C, solution A diluée de manière à avoir une concentration en azote, précipitable par un faible excès de SI, voisine de celle de B.		

tion de pepsine cristallisée (3). Des prélèvements faits immédiatement après le mélange et après cinq jours de digestion nous ont permis de doser, après alcalinisation (pH = 8,2) pour détruire la pepsine et neutralisation consécutive, d'une part, l'azote protéidique total (produits précipitables par l'acide trichloracétique à 2,5 p. 100, à chaud) et, d'autre part, l'azote des anticorps précipité par des quantités croissantes du polysaccharide correspondant (4). Les résultats obtenus dans cette expérience (v. tableau) montrent qu'un quart environ des protéides totaux ont été transformés en produits ne précipitant plus par l'acide trichloracétique, qu'une partie importante des anticorps a été détruite, et que les anticorps restants ont été profondément modifiés. En effet, les rapports

$$R = \frac{\text{milligrammes d'N anticorps dans le précipité spécifique}}{\text{milligrammes de polysaccharide employé}}$$

ont été diminués presque de moitié à la suite de l'action pepsique. Ainsi la même quantité de polysaccharide précipite une quantité d'azote plus petite après l'action de la pepsine sur les anticorps.

Ce fait ne peut pas être dû à la diminution de la concentration

(3) Nous adressons nos remerciements à MM. les D^{rs} J. Northrop (Rockefeller Institute, Princeton) et M. Heidelberger (College of Physicians and Surgeons, New-York) pour leurs conseils et les préparations qu'ils ont mises à notre disposition.

(4) D'après M. HEIDELBERGER et F. KENDALL. *J. Exp. Med.*, **61**, 1935, p 559.

des anticorps, puisque, d'une part, on sait que les rapports R ne sont pas modifiés par dilution et que, d'autre part, les effets de solubilité ne peuvent intervenir ici que d'une façon minime (v. aussi colonne C du tableau). On pourrait supposer que les précipités spécifiques obtenus avec les solutions d'anticorps avant le début de la digestion contiennent, outre l'azote des anticorps, des composés azotés non spécifiques, ces derniers étant éliminés par la digestion. Mais une telle supposition ne cadrerait pas avec de nombreuses expériences faites par divers auteurs démontrant le non entraînement de substances non spécifiques dans les précipitations. Il est, par contre, possible que la digestion pepsique attaque surtout dans la molécule d'anticorps une fraction n'ayant que peu ou pas de groupements réagissant spécifiquement avec l'haptène, la partie qui subsiste est au contraire riche en ces groupements, d'où modification des rapports R dans les précipités spécifiques. Nous espérons que nos recherches en cours d'exécution nous permettront de vérifier cette hypothèse.

MODIFICATION DES PROPRIÉTÉS ANTIGÉNIQUES DES DIVERS MICROBES EN FONCTION DE LEUR STADE DE DISSOCIATION

par N. KOSSOVITCH.

L'auteur étudie les modifications sérologiques des propriétés antigéniques des formes « R » et « S » et des types intermédiaires des bacilles Eberth, Para A, Para B, ayant subi la dissociation spontanée.

L'auteur préconise la technique sérologique utilisée par lui pour établir le rapport quantitatif entre les formes « R » et « S » dans une culture mélangée.

ÉTAT ACTUEL DE LA VACCINATION ANTITUBERCULEUSE PAR LE CHIMIO-VACCIN ET PAR D'AUTRES FRACTIONS ISOLÉES DU BACILLE TUBERCULEUX

par MICHEL MACHEBOEUF et JOSEPH DIERYCK.

En commençant nos recherches sur la vaccination antituberculeuse, nous nous étions proposé d'extraire aux corps bacillaires le plus possible de substances non antigéniques tout en leur

laissant leurs antigènes ; nous espérons ainsi obtenir une préparation de haut pouvoir antigénique dans laquelle les antigènes n'auraient pas leurs activités masquées ou diminuées par des substances inertes ou même gênantes.

Nous avons vu que l'on pouvait, par une technique appropriée (acétone pure et neutre, puis éther anhydre) enlever aux bacilles la plus grande partie de leurs lipides et de leurs acides gras sans extraire les haptènes, ni les antigènes. Nous avons vu également que les alcools éthylique et méthylique, à froid et surtout à chaud, enlèvent une partie des haptènes lipidiques et altèrent les antigènes protidiques. Nous nous sommes convaincus que l'action des alcools réside surtout dans la dislocation de cénapses lipido-protéidiques avec libération de l'haptène lipidique ; pour ce motif, leur emploi est à éviter.

Ayant ainsi délipidé partiellement par l'acétone froid, puis par l'éther, des bacilles tuberculeux, nous avons obtenu des corps microbiens possédant encore tous leurs antigènes ; ils étaient capables de faire naître *in vivo* des précipitines et des sensibilisatrices bien mieux que ne peuvent le faire des bacilles entiers simplement tués. Étaient-ils vaccins ? Pour le savoir, nous avons préparé des émulsions (dans l'eau salée à 9 p. 1.000) de ces corps bacillaires et nous les avons injectées à des animaux (lapins et cobayes) par diverses voies (veine, péritoine, tissus sous-cutanés), à des doses variables.

Ceci nous a montré tout d'abord que la meilleure voie d'introduction était la voie intraveineuse, la voie sous-cutanée étant la moins favorable. Cette première série d'expériences a prouvé que notre préparation est douée de nettes propriétés vaccinales et nous l'avons dénommée chimio-vaccin (1). Les animaux préparés par une série de 6 à 8 injections de chimio-vaccin, puis soumis à l'infection par voie endoveineuse, présentaient une survie un peu supérieure au double de celle des animaux témoins (1935).

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons diminué la dose d'épreuve, dans le but de voir évoluer une infection moins brutale que celle précédemment étudiée. Les animaux témoins sont tous morts en huit mois ; quant aux vaccinés, l'un est mort au huitième mois, trois au vingt-quatrième mois, un fut sacrifié après vingt-huit mois et tous les autres survivent encore à l'heure actuelle (vingt-neuf mois). Chez l'animal sacrifié, nous n'avons trouvé aucune lésion tuberculeuse évidente.

Grâce au chimio-vaccin, nous avons donc réalisé une vaccination très notable du lapin.

Dans une troisième série de recherches, nous nous sommes demandé si ces propriétés vaccinales étaient liées à des substances hydrosolubles. L'extrait aqueux de bacilles partiellement

(1) MACHEBOEUF (M.) et DIERYCK (J.). *C. R. Acad. Sc.*, 202, 1936, 164.

délipidés s'est révélé pratiquement inactif comme vaccin. Les protéides hydrosolubles de cet extrait aqueux ne possèdent donc pas de pouvoir vaccinant ; ils ont cependant une certaine activité antigénique : ceci prouve que le pouvoir vaccinant appartient à des antigènes que n'enlèvent à froid aux bacilles ni l'acétone, ni l'éther, ni l'eau.

L'essai de notre chimio-vaccin chez le lapin nous ayant donné de très nets résultats, nous l'avons essayé chez le cobaye ; ces essais sont encore en cours, mais des essais préliminaires ont déjà donné d'intéressants résultats. Dans ces essais préliminaires, nous n'avons injecté le chimio-vaccin aux cobayes que par la voie sous-cutanée qui, nous le savons déjà, est beaucoup moins favorable que la voie intraveineuse. Malgré des doses infectantes élevées (1/100 de milligramme d'une souche très virulente), l'augmentation de survie fut de 100 p. 100 environ. Nous avons poursuivi ces essais sur le cobaye en injectant le chimio-vaccin par voie veineuse et en utilisant des doses infectantes un peu moins massives. Ces expériences sont en cours, il est encore trop tôt pour en donner le résultat.

Le chimio-vaccin constitue, en somme, un excellent vaccin, mais il ne peut pas être utilisé comme agent thérapeutique de la tuberculose, car s'il est complètement inoffensif pour les sujets sains, il n'en est plus de même pour le sujet tuberculeux. Depuis près de deux ans, nous essayons de résoudre le problème suivant : enlever au chimio-vaccin les substances nocives pour l'animal tuberculeux, tout en n'altérant pas les propriétés des substances vaccinales. Après de nombreux essais infructueux, nous sommes parvenus à obtenir une préparation que nous pouvons injecter impunément aux animaux tuberculeux et qui possède un pouvoir antigène encore meilleur que le chimio-vaccin primitif ; mais nous ne pouvons pas encore affirmer que les substances vaccinales y sont conservées, car son obtention date de moins d'un an et il faudra encore au moins une année avant que l'on puisse se prononcer.

Tels sont, en résumé, les résultats que nous avons obtenus depuis 1934. Ils nous montrent que l'on peut obtenir, avec des produits extraits du bacille tuberculeux, une vaccination très intéressante et ils nous permettent même d'espérer parvenir un jour à l'obtention d'un produit doué de propriétés thérapeutiques au cours de la tuberculose.

RECHERCHES SUR LES ANTIGÈNES SOMATIQUES DE LA FAMILLE DES *SALMONELLA*

par KURT MEYER.

Etudiant depuis plusieurs années la question des antigènes et anticorps complexes, c'est-à-dire présentant différents groupements spécifiques, il nous a paru intéressant de poursuivre ces études dans la famille des *Salmonella*, dont la mosaïque antigénique, grâce aux recherches de Bruce White et F. Kauffmann, est connue jusqu'en ses moindres détails. Les différents types de cette famille contiennent une pluralité de facteurs antigéniques qui sont diversement combinés d'un type à l'autre. Il s'agissait pour nous de déterminer d'abord si ces combinaisons de différents facteurs constituent des espèces chimiques d'une composition constante, ou s'ils représentent seulement un simple mélange de deux substances indépendantes. Nous avons appliqué deux méthodes : nous avons d'abord examiné si en étudiant un grand nombre de souches d'un type on trouve toujours la même relation quantitative des différents facteurs, ce à quoi il faut s'attendre si les facteurs sont réunis dans une seule molécule. Ensuite, nous avons cherché si un sérum actif vis-à-vis d'un seul facteur précipite, dans l'antigène complet préparé d'après Boivin, ce facteur seulement ou également un autre. Pour le dosage quantitatif des facteurs, nous nous sommes servi du procédé de la fixation d'alexine.

Les deux méthodes ont donné un résultat concordant : il parle en faveur d'une liaison des différents facteurs dans un seul complexe moléculaire. L'éventualité que, dans la deuxième méthode, il s'agisse d'une simple adsorption des facteurs hétérologues par le précipité spécifique a été éliminée par une expérience portant sur un antigène complet (souche *East Africa*) renfermant, à côté des facteurs spécifiques VI et VII, l'antigène Vi : les précipités obtenus soit avec un sérum anti-VI, soit avec un sérum anti-VII, contenaient les deux facteurs VI et VII dans le même rapport quantitatif que l'antigène d'origine ; ils étaient libres d'antigène Vi ; tandis que les facteurs spécifiques restent réunis, l'antigène Vi, indépendant de ceux-ci d'après les recherches chimiques de Boivin et Mesrobeanu, ne rentre pas dans le précipité. L'adsorption ne peut donc jouer qu'un rôle minime.

VACCINATION DU LAPIN CONTRE L'ÉPITHÉLIOMA DE L'ESTOMAC

par A. BESREDKA et L. GROSS.

L'estomac du lapin présente, vis-à-vis de l'épithélioma de Brown-Pearce, la même réceptivité que les autres organes : on assiste, après une courte période d'incubation, à la formation d'une tumeur, plus ou moins volumineuse, siégeant au niveau de l'inoculation. Son évolution est la même que celle des tumeurs sous-cutanées ou intratesticulaires : suivant le cas, la tumeur néoplasique de l'estomac régresse et finit par se résorber ou bien elle continue à progresser et donne naissance à des métastases mortelles dans la moitié des cas environ.

Les lapins, préalablement vaccinés par la voie intracutanée, deviennent réfractaires à l'inoculation de l'épithélioma dans l'estomac : l'immunité ainsi obtenue est solide.

M. Maignon. — Il est intéressant de rappeler que le soufre et le glutathion, qui semblent jouer un rôle important dans la fonction antitoxique comme des travaux récents l'établissent, se trouvent particulièrement abondants dans les surrénales, le foie et aussi la peau (corps muqueux de Malpighi). Cette constatation ne serait-elle pas en rapport avec le rôle de la peau dans les phénomènes d'immunité, mis en évidence par M. Besredka ?

SUR L'IMPORTANCE DES DONNÉES DE L'HISTO-PHYSIOLOGIE EXPÉRIMENTALE DANS L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ

par A. PEYRON, POUMEAU-DELILLE et P. MERCIER.

M. Peyron. — A propos de l'exposé de M. Besredka et comme résumé de ma propre communication, j'indiquerai brièvement que nos recherches poursuivies depuis deux ans sur les réactions histiocytaires en utilisant la coloration vitale par le bleu trypan, suivie de fixation par le Susa, révèlent le point faible de la théorie de M. Besredka en ce qui concerne l'immunité locale. Il existe, en effet, dans le derme et le tissu sous-cutané, des histiocytes d'origine locale provenant des fibroblastes et du tissu adipeux : ils

correspondent peut-être au système cellulaire de défense que notre collègue envisage théoriquement, mais sans avoir fait son étude histologique ni suivi ses variations expérimentales ; or, cette dernière méthode est indispensable pour pouvoir démontrer et analyser les réactions cellulaires d'immunité s'effectuant dans un cadre local. D'autre part, les figures que je vous montre, et les préparations présentées à ma démonstration prouvent que les phénomènes d'immunité générale se traduisent par une réaction des histiomonocytes du sang, qui s'oppose précisément aux simples réactions histiocytaires d'ordre local. En ce qui concerne le cancer expérimental, M. Besredka essaie de lui appliquer sa doctrine, mais elle ne cadre pas avec les faits, en particulier sur les trois points suivants qui sont fondamentaux : 1° Pour le sarcome de la souris et de l'épithélioma cutané transplantable du lapin (Brown-Pearce), il ne s'agit pas comme il le croit d'une inoculation transformant les tissus de l'animal porteur, mais du simple phénomène banal de la greffe ; 2° Il a décrit une transmission du sarcome de la souris au rat, en réalité l'hétéro-greffe est impossible et aucun des cas publiés ne résiste à la critique. C'est seulement dans les sarcomes de l'oiseau qu'on peut mettre en évidence une inoculation associée à la greffe ; et consécutivement l'existence de deux résistances distinctes, l'une contre la cellule, l'autre contre le virus ; 3° Il considère, en particulier pour le sarcome de la poule, que la régression expérimentale d'une tumeur est liée à son siège dans l'épiderme et à une réaction de ce même plan cellulaire de défense auquel il rattache l'immunité locale. Je soutiens, au contraire, d'accord avec la plupart sinon l'unanimité des cancérologues, que cette régression spontanée ou expérimentale des tumeurs est un processus d'ordre général, aussi bien par son siège que par son mécanisme. Je lui demande s'il maintient son opinion sur ces trois points, et je souligne que mes critiques ne sauraient diminuer l'intérêt qui s'attache aux expériences brillantes et ingénieuses qu'il a conçues à propos de l'immunité locale. Malheureusement il n'a pas utilisé les notions d'histophysiologie expérimentale indispensables à leur interprétation ; et je suis persuadé que s'il le fait dans l'avenir, il sera conduit à abandonner ses conclusions actuelles.

M. A. Besredka. — A des faits d'ordre expérimental relatifs à l'épithélioma chez le lapin, M. Peyron oppose des considérations d'ordre théorique sur la nature des tumeurs malignes, lesquelles n'ont que des rapports fort éloignés avec le sujet de ma communication.

Contrairement à ce que pense M. Peyron, l'intérêt des tumeurs intracutanées réside dans le fait que, de toutes les localisations connues jusqu'à présent, c'est la seule qui comporte une résorption quasi-constante, ce qui permet à l'expérimentateur de rendre

le lapin réfractaire, à *volonté*, à toute nouvelle injection de l'épithélioma en n'importe quel point de l'économie et, entre autres, dans l'estomac.

Prof. **Pittaluga**. — Les réactions histiocytaïres contre la prolifération de cellules néoplasiques, surtout hétérologues ou en somme non autochtones, sont sans doute importantes ; mais nous sommes loin d'avoir la preuve d'une origine mésenchymateuse, liée à l'activité des cellules du système réticulo-endothélial, soit des phénomènes de résorption et d'élimination des greffes ou des inoculations de virus cellulaires, soit *a fortiori* des processus d'immunisation ou de défense contre ces virus. On peut penser que les histiocytes et en général les cellules du système réticulo-endothélial participent ou même qu'elles sont directement responsables de ces processus biochimiques, mais on ne peut pas l'affirmer en l'état actuel de nos connaissances. La peau est très riche en système réticulo-endothélial. Le réseau histiocytaire du derme représente un secteur important de l'activité globale du système réticulo-endothélial. Cela nous permet d'attribuer à la peau une haute hiérarchie dans les mécanismes de l'immunisation — locale ou générale. Mais, ici aussi, il n'est pas possible aujourd'hui de considérer comme correspondants, voire même comme réversibles, les fibroblastes d'un côté, les histiocytes ou les cellules réticulaires du tissu réticulo-adénoïde des organes hématopoiétiques de l'autre côté. Ces généralisations ne sont pas admissibles, dans mon opinion, en l'état actuel de nos connaissances.

POUVOIR FLOCCULANT ET PROTECTEUR DES SÉRUMS ANTICARBONNEUX DE LAPINS

par N. STAMATIN et W. SCHAEFER.

En étudiant comparativement les propriétés flocculantes des sérums anticharbonneux de lapins et leurs propriétés protectrices vis-à-vis de l'infection expérimentale du cobaye, nous avons fait les constatations suivantes :

1° Il n'y a aucun rapport entre la valeur protectrice d'un sérum et son pouvoir flocculant vis-à-vis de l'antigène capsulaire ou vis-à-vis de l'antigène somatique de la bactérie. Parfois même des sérums sans anticorps flocculants protègent mieux que les sérums riches en anticorps capsulaires ou somatiques ;

2° Les souches non capsulogènes, mais oedématogènes, produi-

sont des anticorps protecteurs aussi actifs que les anticorps produits par des souches capsulogènes ;

3° L'activité protectrice des sérums anticharbonneux n'est pas proportionnelle à la quantité d'antigène injecté. Les sérums d'animaux longtemps immunisés sont en effet moins efficaces parfois que les sérums d'animaux immunisés pendant un temps relativement court.

SOUCHES DE MUTATION DU BACILLE DYSENTÉRIQUE DES NOUVEAU-NÉS OBTENUES PAR PASSAGES SUR LES ANIMAUX

par MARGUERITE AITOFF.

Nous avons isolé, en décembre 1935, dans les selles de nouveau-nés, lors d'une entérite épidémique grave, un bacille Gram négatif, présentant les caractères d'un bacille dysentérique type Flexner. Il s'en distingue par sa grande virulence pour tous les animaux de laboratoire et par la présence de deux toxines : entérotrope et neurotrope.

Nous avons proposé au II^e Congrès de Microbiologie, à Londres, d'appeler ce bacille, vu sa provenance rare, bacille dysentérique des nouveau-nés.

La souche primitive, repiquée environ deux fois par mois depuis plus de deux ans, a gardé ses caractères biochimiques et morphologiques, mais a perdu un peu de sa virulence.

Parallèlement, nous faisons des passages sur les animaux pour accroître la virulence de la souche. Après une trentaine de passages, en même temps que l'accroissement de la virulence, nous notions une exagération de l'odeur fécaloïde et l'apparition de quelques éléments mobiles.

L'inoculation aux animaux de cette souche légèrement transformée donne, dans 75 p. 100 des cas (42 fois sur 56 animaux), une mutation curieuse, caractérisée surtout par la transformation des réactions de fermentation. Alors que la souche inoculée conserve les réactions à type Flexner, la souche isolée du sang du cœur présente les réactions à type Shiga (ne fait plus fermenter ni mannite, ni maltose).

Chacune des 2 souches de mutation a été repiquée en série sur milieux artificiels en gardant ses caractères de fermentation respectifs.

La transformation n'est pas réversible.

Le repiquage sur milieux riches en albumine et même la conser-

vation des souches pendant des mois dans du sang de lapin à la glacière ne transformaient pas les réactions de fermentation. Les transformations biochimiques se produisent *in vivo* dans l'organisme de l'animal, mais jamais *in vitro*.

La parenté sérologique entre les deux souches de mutation et la souche primitive reste très étroite (agglutination et réaction de Shwartzman).

Prof. J. J. van Loghem. — D'abord, je voudrais rappeler que des recherches sur la variabilité du bacille dysentérique ont démontré qu'il est possible d'obtenir des « clones » qui se distinguent des « clones »-mères par leurs fonctions biochimiques et leur structure antigène. Un de mes collaborateurs, Korthof, a employé — il y a vingt ans — le sac à collodion dans la cavité péritonéale du cobaye pour transformer le « Flexner » en « Y ».

Ensuite, je me permets de revenir sur la question déjà touchée ce matin pendant la discussion du rapport de M. Boivin. A mon avis, il faut se rendre compte que le terme « mutation » est souvent employé à tort par les bactériologistes. J'ai un certain droit à demander l'attention du Congrès pour cette question. La notion de « mutation » est d'origine néerlandaise : Hugo de Vries l'a conçue pour indiquer la naissance d'une nouvelle espèce, c'est-à-dire un changement dans la constitution génotypique.

Nous sommes bien sûrs que les variations bactériennes que nous observons journellement dans notre laboratoire, et qui souvent se montrent très « fixes », ne sont que des adaptations. La création d'une nouvelle espèce n'est pas à traiter en bagatelle. Il est nécessaire que les bactériologistes se rendent mieux compte que les variations bactériennes appartiennent, en général, au domaine de la physiologie bactérienne. Il y a là, il me semble, une question qui pourrait mériter de figurer à l'ordre du jour de notre prochain Congrès : *la purification de la terminologie de la variabilité bactérienne*.

M. Boivin fait remarquer qu'il conviendrait, avant de parler de transformation du bacille de Flexner en bacille de Shiga, d'étudier à fond les « structures antigéniques » de la bactérie initiale et de la variante finalement obtenue. Les caractères biochimiques des microbes sont susceptibles de présenter parfois des changements étendus, alors qu'on ne connaît pas, semble-t-il, d'exemple vraiment probant du passage d'un type sérologique à un autre type de structure antigénique absolument distincte.

RECHERCHES IMMUNOCHIMIQUES SUR LA LÈPRE

II. ÉTUDE DE L'HAPTÈNE SPÉCIFIQUE

par V. CHORINE et GEORGETTE LÉVY.

Dans un travail antérieur (1), nous avons montré qu'il est possible d'extraire, à partir de lépromes de rats infectés avec le bacille de Stefansky ou en partant de lépromes humains, toute une série d'haptènes fixateurs que l'on peut répartir en deux catégories.

1° Des haptènes non spécifiques réagissent non seulement avec les sérums lépreux, mais également avec les sérums tuberculeux et syphilitiques. Ces haptènes semblent devoir être rapprochés du point de vue chimique de ceux qui, dans les bacilles tuberculeux, sont des haptènes de fixation très actifs et qui sont des acides phosphatidiques.

2° Des haptènes spécifiques qui ne réagissent pas avec les anticorps contenus dans les sérums tuberculeux, ni syphilitiques. Ces haptènes réagissent avec de nombreux sérums de malades atteints de lèpre tubéreuse et avec une faible proportion de malades atteints de lèpre nerveuse.

Nous avons étudié plus particulièrement la fraction capable de nous fournir cette deuxième série d'haptènes, en particulier la sous-fraction extraite par l'acétone et soluble dans l'éther que nous avons appelée A_3 . Elle fixe spécifiquement l'alexine à des dilutions de l'ordre de 1 p. 10.000 et 1 p. 20.000 en présence de nombreux sérums de malades atteints de lèpre tubéreuse, de quelques sérums de lèpre nerveuse et a été constamment négative avec les sérums syphilitiques et tuberculeux.

L'activité de cet extrait nous étant apparue comme relativement peu élevée en comparaison de l'activité que nous avons obtenue par ailleurs avec des haptènes extraits de bacilles tuberculeux, nous avons cherché à purifier cette fraction en éliminant les substances inactives qui s'y trouvent mélangées.

Parmi les différents modes de purification que nous avons essayés, la distillation fractionnée dans l'alcool méthylique nous a permis de doubler l'activité de cet haptène.

Nous avons également étudié la spécificité de cette fraction A_3 en l'extrayant avec la même technique de différentes souches de cultures de bacilles acido-résistants que nous avons traités dans les mêmes conditions que les lépromes.

(1) Congrès de la lèpre. Le Caire, 1938.

Nous avons ainsi essayé des fractions provenant de souches Aviaires, Bovine-Vallée, Humaine et Fléole. Certaines se sont montrées très actives, mais peu spécifiques, d'autres absolument négatives. Mais, pour avoir véritablement un extrait spécifique, nous avons constaté qu'il est nécessaire d'extraire la substance active des lépromes de rats ou des lépromes humains, le même extrait provenant de souches différentes étant inactif ou peu spécifique. Cette étude a été faite simultanément, vis-à-vis de sérums lépreux et tuberculeux.

Par ailleurs, nous avons essayé à partir de lépromes de rats infectés avec le bacille de Stefansky d'obtenir l'antigène somatique complet O. Nous nous sommes servis de la technique de Boivin-Mesrobeanu que nous avons appliquée aux lépromes en modifiant le début, puisque nous travaillions sur des tissus. Au lieu de diluer les bacilles dans l'eau comme le fait Boivin, nous avons broyé directement les lépromes dans l'acide trichloracétique afin de ne pas diluer trop nos solutions. Les extraits obtenus essayés avant et après dialyse ont été inactifs dans la déviation du complément et dans les réactions de la floculation avec les sérums lépreux.

DEUXIÈME SÉANCE

PREMIER RAPPORT

LES FACTEURS DE CROISSANCE POUR LES MICROORGANISMES

par ANDRÉ LWOFF.

Le texte du rapport est publié dans la brochure adressée aux membres de l'Association et dans ces *Annales*, 61, p. 580.

DISCUSSION DU RAPPORT :

M. Schopfer. — L'accord est actuellement fait en ce qui concerne le rôle physiologique des facteurs de croissance. On peut envisager de diverses manières la définition de facteur de croissance. M. Lwoff ensemence ses milieux avec des souches totalement privées de facteurs de croissance par repiquages successifs. Pour des raisons d'ordre pratique, nos ensemencements sont effectués avec une souche développée sur un milieu riche en facteurs de croissance (milieu naturel). Dans ce cas, les cultures témoins, sans facteurs de croissance exogènes présentent un développement très léger ; celui-ci est dû, non pas à une synthèse partielle de la part de l'organisme, mais bien au fait que l'inoculat introduit dans le milieu synthétique une faible dose de facteur de croissance. Les divers organismes que nous avons étudiés attestent, après repiquage, une perte totale du pouvoir de synthèse de leurs facteurs de croissance ; ils ne se multiplient plus.

M. Lwoff. — Si le faible développement de *Rhodotorula* observé par M. Schopfer dans sa première culture témoin est dû à des traces de facteurs de croissance, et si le développement s'arrête par la suite au cours des repiquages ultérieurs, la pyrimidine est manifestement un facteur de croissance conformément à notre définition des facteurs et conformément à la conclusion de M. Schopfer.

Prof. G. Bertrand. — Puisque nous sommes entre microbiologistes de langue française, j'espère que vous ne trouverez pas

étonnant si je m'élève contre la dénaturation du sens, cependant très clair, de l'expression « facteurs de croissance ». Le mot français *facteur* vient, presque sans modification, du mot latin *factor*, dérivé lui-même de *facere*, faire. Un facteur c'est, communément, celui qui fait une certaine chose, qui accomplit un acte déterminé. En science, on ne l'applique pas seulement à l'homme; on l'utilise, par exemple, en mathématique et en physiologie; on distingue aussi des facteurs physiques et des facteurs chimiques, etc. L'expression de « facteurs de croissance » ne peut être équivalente, en biologie, que de causes, d'agents physiques ou chimiques, intervenant favorablement sur le développement d'êtres vivants.

Il ne me paraît pas défendable de convenir que tout cela doit être changé, que la lumière nécessaire à la croissance des plantes supérieures, que des composés minéraux indispensables à la formation des tissus de presque toutes les espèces végétales, que les sucres, les graisses et les matières protéiques dont ne peuvent se passer les animaux, ne sont pas des facteurs de croissance.

Jusqu'ici, les substances étudiées sous l'expression conventionnelle de « facteurs de croissance » par un certain nombre de microbiologistes ne sont manifestement pas d'autres choses que des aliments et, d'une manière plus spéciale, des aliments du type catalytique. Si des chercheurs éprouvent le besoin, pour faciliter l'interprétation de leurs découvertes, de se servir d'une expression nouvelle, je pense qu'ils pourraient employer celle de facteurs de croissance ou d'aliments spécifiques, ou mieux, spéciaux, ou mieux encore, différentiels. Les biochimistes, les physiologistes, les agronomes, les médecins, ne seraient plus obligés de déclarer que les matières minérales pour les plantes, que les sucres, les graisses ou l'albumine pour l'homme ne sont plus des facteurs de croissance et les faits en discussion resteraient très bien dans le cadre des conceptions actuelles de la biologie générale.

M. Lwoff. — L'expression « Facteurs de croissance » est peut-être mauvaise, mais il n'est malheureusement pas possible de conformer le sens actuel des mots ou expressions à leur sens étymologique. L'expression « facteurs de croissance » ne prête pas à confusion, parce que les microbiologistes s'accordent à lui reconnaître la définition que j'en ai donnée dans mon rapport.

M. Friedheim. — Il me semble qu'il est peut-être un peu imprudent, comme le fait M. Schopfer, de vouloir comparer strictement l'action des facteurs de croissance chez les micro-organismes avec ceux des organismes supérieurs, les vitamines en particulier. Chez ces derniers, outre la possibilité de synthèse, doit exister la possibilité d'utilisation. Par exemple, dans 3 cas

étiquetés cliniquement hypovitaminose A, nous avons pu mettre en évidence une quantité exagérée de vitamine A dans le sérum avec un taux normal de carotène, laissant supposer une possibilité suffisante de synthèse avec une diminution du pouvoir d'utilisation.

M. Lwoff. — On ne connaît jusqu'ici aucune substance augmentant l'intensité de la respiration qui soit capable de remplacer un facteur de croissance.

M. Dujarric de la Rivière rappelle les expériences poursuivies par Kollath sur le rôle de certains sels de fer dans la croissance d'*Hæmophilus influenzae*.

M. Lwoff. — Les conclusions de Kollath n'ont jamais été confirmées, non plus que les travaux de Baudisch et de ses collaborateurs, relatifs à l'action de certains sels de fer doués de propriétés magnétiques particulières. Il semble que ce ne soit pas le fer qui soit important, mais la structure de la porphine. Au demeurant, la spécificité des facteurs paraît assez étroite.

COMMUNICATIONS

SYMBIOSE ET FACTEURS DE CROISSANCE

par W. H. SCHOPFER.

(*Institut botanique de l'Université, Berne.*)

Depuis longtemps déjà, on a émis l'hypothèse que certains phénomènes de symbiose devaient être en relation avec le problème des vitamines (Portier et Randoin, Burgeff, Koch, etc.). Grâce aux progrès réalisés par la question des vitamines, particulièrement en ce qui concerne le rôle de ces substances chez les végétaux, il nous est possible de discuter ce problème sur la base de cas concrets, étudiés expérimentalement. L'un de ceux-ci a été l'objet de recherches faites dans mon laboratoire, par W. Müller.

Nous savons que l'aneurine est un facteur de croissance indispensable à de nombreux organismes. Il est établi que la perte du pouvoir de synthèse de l'aneurine s'accomplit par étapes. Une levure rouge [*Rhodotorula rubra*] (1) qui requiert l'aneurine,

(1) SCHOPFER (W. H.). *Comptes rendus de l'Ac. des Sc.*, 205, 1937, p. 445.

n'exige en réalité que la pyrimidine; une Mucorinée du sol [*Mucor Ramannianus*] (2) se contente du thiazol. Nous avons montré expérimentalement que le constituant non requis (pyrimidine pour *Mucor Ramannianus*, thiazol pour *Rhodotorula*) est synthétisé; avec le constituant exigible, l'aneurine peut être reformée.

Sur milieu strictement synthétique, sans facteur de croissance, aucun de ces deux microorganismes ne se développe d'une manière appréciable. Par contre, si la levure et la moisissure sont cultivées ensemble, les deux se développent normalement, quoique aucun facteur de croissance n'ait été ajouté au milieu.

Pour expliquer ce fait, il faut admettre que chacun des partenaires fournit à l'autre le constituant manquant.

<i>Rhodotorula rubra</i>		<i>Mucor Ramannianus</i>	
aneurine	} synthétise le thiazol.	synthétise la pyrimidine	} aneurine.

Il s'agit donc d'un cas parfaitement caractérisé de symbiose artificielle, conditionné uniquement par les facteurs de croissance.

Les phénomènes sont encore plus nets si l'on inocule sur un milieu solide (sans facteur de croissance) un petit fragment du thalle mixte, extrait du milieu liquide; il se développe alors à la surface du milieu solide un « organisme » qui ne possède les caractères cultureux ni de la levure, ni du *Mucor*. Sa structure crevassée rappelle étrangement celle d'un lichen.

Depuis le moment où le cas a été signalé (2), il a été possible, après plusieurs repiquages, de conserver à cette symbiose sa morphologie particulière.

Il est peu probable que, dans la nature, ces deux microorganismes arrivent à se rencontrer. Cependant, si tel était le cas, le mycologiste, ignorant le rôle des facteurs de croissance, utilisant la méthode analytique, arriverait, après séparation et identification des deux constituants et après des essais de culture en milieu synthétique, à la certitude qu'aucun d'eux n'est viable séparément: il reconnaîtrait à cette association les caractères d'une symbiose véritable et arriverait au point même où nous a conduit la méthode synthétique.

Pour l'instant, il s'agit d'une expérience de laboratoire analogue à celle signalée par Kögl; elle garde toute sa signification et montre que les vitamines et les facteurs de croissance (particulièrement l'aneurine) jouent un rôle important dans la symbiose et qu'elles font partie du complexe de facteurs qui déterminent la genèse de ce phénomène.

(2) MÜLLER (W.) et SCHOPFER (W. H.). *Ibid.*, p. 687.

LA SPÉCIFICITÉ D'ACTION DE L'ANEURINE SUR QUELQUES MICROORGANISMES ACTION D'UN HOMOLOGUE DE L'ANEURINE

par W. H. SCHOPFER.

Divers travaux (Schopfer, Sinclair, Robbins pour *Phycomyces*, Knight pour *Staphylococcus*, A. Lwoff et Dusi pour les *Flagellés*) ont démontré que l'action de l'aneurine, ou de ses deux constituants, est assez rigoureusement spécifique. Le groupe amino-primaire est indispensable. Nous pouvons de plus démontrer qu'un homologue de l'aneurine, dont la pyrimidine contient en position 2 un groupe éthyle au lieu du méthyl, est fortement actif sur *Phycomyces blakesleeanus*, *Ustilago violacea*, *Rhodotorula rubra*, *Dematium nigrum*; *Parasitella simplex* et *Absidia ramosa*. Pour les organismes qui se contentent de la pyrimidine (*Rhodotorula rubra*, par exemple), la 2-méthyl-4-amino-5-aminométhyl-pyrimidine peut être remplacée par la 2-éthyl-4-amino-5-aminométhyl-pyrimidine. Le groupe CH_3 en position 2 de la pyrimidine n'est donc pas important. Fait singulier, l'homologue de l'aneurine étudié ici est plus actif sur *Phycomyces* que l'aneurine elle-même.

Il faut tenir compte de ce fait lors de la comparaison des résultats fournis par les trois tests : 1° *test animal*, l'homologue n'a que la moitié environ de l'action de l'aneurine ; 2° *test thiochrome*, ce produit d'oxydation de l'aneurine se formant également à partir de l'homologue, et 3° *test Phycomyces*, qui réagit à la présence de l'aneurine et plus fortement à celle de l'homologue. Nous ne savons rien sur la présence de ce dernier dans les produits naturels. (La substance utilisée nous est aimablement fournie par les Etablissements Hoffmann-La Roche, Bâle.)

M. Chodat demande si les substitutions réalisées sont chimiquement très difficiles à faire et dans quelle mesure on peut faire l'hypothèse que les organismes sont capables d'accomplir ces transformations ? Auquel cas, le problème de la valeur de divers composés substitués prendrait une orientation différente.

M. Schopfer. -- 1° Si la substitution ne porte pas sur un groupe important, on peut admettre que le nouveau composé (en l'espèce éthyle-aneurine) ne subit pas de modifications de structure sous l'influence de l'organisme qui l'absorbe. Mais une transformation intracellulaire n'est pas impossible : il faudrait

admettre alors que l'homologue de l'aneurine serait transformé en aneurine véritable. Il ne s'agit là que d'une hypothèse.

2° On connaît de nombreux cas de symbiose artificielle dans lesquels la morphologie de l'association est différente de celles des deux partenaires. Ce qui est intéressant et nouveau, c'est qu'ici, les deux parties de la molécule d'aneurine déterminent la réunion de la levure rouge et du mucor.

DEUXIÈME RAPPORT

FACTEURS DE CROISSANCE ET TOXINOGENÈSE

par PAUL BORDET.

Le texte du rapport est publié dans la brochure adressée aux membres de l'Association et dans ces *Annales*, 61, p. 618.

DISCUSSION DU RAPPORT.

M. Loiseau. — Avec le milieu de culture dont M. Paul Bordet a rappelé la formule, nous avons obtenu depuis quatre ans les résultats exprimés en unités antigéniques dans le tableau suivant :

	1934	1935	1936	1937	1938 (janvier à juillet)
Moyennes en unités antigéniques.	32,4	39	36,9-39,2	35,3-35,4	40,6-46,2
Maxima	39	50	41-45	51-48	42-54
Minima.	31	33	33-35	26-29	36-33

Les deux valeurs indiquées de 1936 à 1938 correspondent à deux modes de conservation de la souche employée.

En comparant ces résultats avec ceux annoncés par M. Bordet, nous avons éprouvé quelque surprise et nous ne pouvons vraiment accepter la paternité d'un milieu préparé suivant nos indications et qui a donné des résultats si irréguliers et si inférieurs. En effet, écrit-il, « souvent aux environs de 15 unités par centimètre cube, le titre de la toxine obtenue n'a que rarement dépassé 20 unités ; très souvent, les cultures ne se développaient que de façon très maigre, fournissant une toxine titrant moins de 10 unités, et même, comme ce fut le cas pour un quart des lots préparés au cours d'une année, moins de 5 unités ».

Les valeurs du pH final de quelques bouillons témoins (p. 103) variant de 5,9 à 6,8, indiquent certainement de graves erreurs dans ces fabrications et donnent à l'emploi de la levure, dans ces conditions, un caractère de nécessité que nous n'avons jamais observé avec notre milieu.

Nous connaissons bien les effets des extraits de levure sur la production de la toxine diphtérique, puisque les expériences de Mustafa, à peine postérieures à celles de P. Bordet, ont montré que l'addition de ces extraits, au bouillon préparé au laboratoire de la diphtérie, permet un gain de 16 unités environ, sur des toxines titrant de 37 à 40 unités dans les ballons témoins ; dans des milieux moins favorables à l'élaboration de la toxine, préparés avec des peptones commerciales et donnant des valeurs de 13 à 15 unités, sensiblement du même ordre que celles obtenues par P. Bordet, l'action de l'extrait de levure et de la vitamine B₁ cristallisée (Bevitine) permettait d'obtenir des toxines titrant 50 et 53 unités.

Ces remarques n'enlèvent rien à l'intérêt des recherches de P. Bordet, mais l'emploi systématique de la levure ne nous paraît pas indispensable pour obtenir, avec notre milieu, une toxine diphtérique de valeur antigène élevée.

M. Nelis. — Avant l'amélioration apportée par M. Paul Bordet pour la préparation de la toxine et de l'anatoxine diphtériques et consistant dans l'addition de levure au bouillon, il existait une différence très nette entre la valeur antigénique de l'anatoxine de l'Institut Pasteur de Paris (30 à 40 u. a.) et celle de l'Institut Pasteur du Brabant (12 à 16). Depuis l'addition de levure au bouillon, l'Institut Pasteur du Brabant prépare actuellement des anatoxines diphtériques dont le titre antigénique est équivalent à celui de l'Institut Pasteur de Paris et atteint en moyenne 35 à 40 u. a. par centimètre cube.

M. Grasset. — Nous avons utilisé au cours de ces dernières années, pour la production de la toxine diphtérique servant à la production du sérum antidiphtérique et de l'anatoxine diphtérique, la technique utilisée actuellement à l'Institut Pasteur. Cette technique nous a donné dans l'ensemble de bons résultats. mais, il faut le dire, des résultats irréguliers. En introduisant dans le milieu de la levure de boulanger — sans connaissance des travaux de M. Paul Bordet — nous avons obtenu des résultats plus réguliers du pouvoir antigénique des toxines ainsi produites.

M. Louis Martin. — En vous écoutant, je viens de revivre quarante-deux ans de ma vie. Pendant ce temps, j'ai utilisé de nombreux procédés dont vous parlera mon collaborateur, le D^r Loiseau.

Je tiens à rappeler que c'est le bacille de Park et Williams qui a été utilisé. C'est l'Américain VIII que nous avons tous utilisé et qui nous a donné les meilleurs résultats. Mais, tandis qu'en Amérique le bacille a gardé sa virulence, chez nous son activité est devenue de plus en plus grande.

Le microbe joue un très grand rôle dans la production de la toxine diphtérique. A chaque changement de milieu, il faut habituer le microbe au nouveau milieu. Ceci peut expliquer les résultats différents obtenus à Paris et à Bruxelles. Les microbes se sont adaptés aux milieux et donnent de bons résultats dans les deux cas.

COMMUNICATIONS

LA PRODUCTION DES TOXINES DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE, STAPHYLOCOCCIQUE EN VUE DE L'OBTENTION DES ANATOXINES CORRESPONDANTES

par G. RAMON.

Depuis la découverte de la toxine diphtérique faite par E. Roux et A. Yersin, il y a exactement un demi-siècle (1888) jusqu'à celle des anatoxines (1923), les toxines ont été presque exclusivement réservées à des fins expérimentales ou à la préparation des sérums antitoxiques.

L'extension prise, en peu d'années, par les vaccinations anatoxiques a exigé des quantités de plus en plus considérables des différentes anatoxines. A l'heure actuelle, certains laboratoires doivent préparer annuellement des milliers de litres d'anatoxine. Ainsi ont été posés nombre de problèmes se rapportant, en premier lieu, à la production des toxines correspondantes.

Les principales questions à résoudre concernent les milieux de culture au sein desquels les microbes toxigènes doivent élaborer leur toxine spécifique.

Il importe :

Que ces milieux soient d'une préparation simple, pratique, économique.

Qu'ils aient une composition telle que la toxine produite puisse être, dans la suite, facilement transformée en anatoxine.

Qu'ils conduisent, grâce à l'utilisation de souches microbiennes toxigènes et à certaines modalités de végétation de celles-ci, à l'obtention de toxines et partant d'anatoxines dont la valeur antigène doit être aussi grande que possible.

Ce sont ces principes qui, depuis douze ans, ont servi de

guides, à l'Institut Pasteur, dans la production des toxines diphtérique, tétanique et staphylococcique.

TOXINE DIPHTÉRIQUE. — La base du milieu utilisé demeure, pour le moment, la peptone Martin dont certains détails de préparation ont été modifiés (Loiseau et Philippe).

A la macération et à la fermentation de viande de veau opérée à la température de l'étuve a été substituée la macération à froid (G. Ramon).

Au mélange de peptone Martin et de liquide de macération de viande de veau ont été ajoutés des sucres (G. Ramon), puis un régulateur de réaction : l'acétate de soude (A. Berthelot et G. Ramon).

Grâce à ces perfectionnements successifs du milieu et à diverses améliorations introduites dans la technique de la culture du b. diphtérique (G. Loiseau et M. Philippe) la valeur de la toxine est passée progressivement de 8 unités à 15, à 30, à 50 unités. A l'heure présente, la toxine diphtérique, produite dans le milieu composé de peptone obtenue par l'hydrolyse pepsique de panses de porc, de macération à froid de viande de veau, de sucre (glucose et maltose) et d'acétate de soude, atteint régulièrement un titre moyen de 40 à 50 unités pour une production de 100 à 150 litres par semaine.

La valeur antigène relativement élevée de l'anatoxine que l'on prépare facilement à partir d'une telle toxine a permis de réduire de 3 à 2 le nombre des injections nécessaires pour obtenir, lors de la vaccination antidiphtérique, une immunité solide et durable chez la plupart sinon chez tous les individus vaccinés (G. Ramon et collaborateurs).

TOXINE TÉTANIQUE. — Différentes recherches ont été effectuées au cours de ces douze dernières années ayant pour but la détermination des conditions *optima* de production de la toxine tétanique : choix, entretien, ensemencement des souches toxigènes, etc. [G. Ramon et J. Barotte (1926)], influence du pH des bouillons, addition de glucides, choix des régulateurs de réaction tels que pyruvate, phosphate de sodium, etc. (A. Berthelot, G. Ramon et M^{lle} Amoureux, 1927), etc.

Ces recherches ont permis d'établir de nombreuses formules de milieux de culture. A l'heure présente plusieurs formules sont utilisées :

Un milieu à base de peptone Martin et de macération de viande de veau, le mélange étant additionné de glucose (M. Philippe et G. Loiseau). Les filtrats toxiques obtenus à partir de ce milieu tuent le cobaye de 350 grammes à la dose de 1/30.000 de centimètre cube environ et titrent en moyenne 10 à 12 unités (unités antigènes déterminées par la floculation).

Un milieu composé de macération de viande de bœuf, de peptone pepsique de viande de bœuf (préparée au laboratoire), de glucose, de poudre de globules rouges cuits (R. Legroux et G. Ramon). La dose minima mortelle des filtrats toxiques que l'on prépare en utilisant ce milieu varie entre 1/50.000 et 1/100.000 de centimètre cube (parfois moins encore). Leur titre est en général compris entre 20 et 30 unités.

Enfin un milieu à base de digestion pepsique de viande de bœuf et de foie additionné de glucose, de pyruvate, de phosphate de sodium (A. Berthelot, A. Prévot). La toxine élaborée dans un tel milieu est capable de tuer le cobaye jusqu'à 1/120.000 de centimètre (moyenne 1/75.000). Sa valeur antigène varie entre 20 et 40 unités. Cependant, en raison de sa composition, elle exige une assez grande quantité de formol pour sa transformation complète en anatoxine. Il en résulte que celle-ci a une valeur antigène nettement plus faible que la toxine d'où elle est issue.

TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE. — Pour l'obtention de la toxine staphylococcique, la plupart des expérimentateurs à la suite de Burnet (1930) se sont adressés à des milieux de culture assez complexes : milieux semi-liquides composés de gélose et de bouillon. Il a semblé préférable de recourir à des milieux analogues à ceux employés pour la production de la toxine diphtérique, tout en maintenant dans les ballons, au cours de la culture, la circulation d'air et de gaz carbonique.

C'est ainsi que sont employés :

Un milieu à base de peptone pepsique de viande de veau (G. Ramon). On utilise plus simplement encore la peptone Martin (hydrolyse pepsique de panses de porcs). Ensemencés avec une souche appropriée, ces milieux fournissent un filtrat dont la valeur antigène est en moyenne de 10 unités au centimètre cube.

Un milieu à base de rate de veau et de peptone pepsique de viande de bœuf, du commerce (G. Ramon, A. Berthelot et M^{lle} G. Amoureux). Une souche spéciale (souche Wood) ensemencée sur ce milieu permet d'obtenir une toxine staphylococcique titrant 15 à 20 unités et pouvant atteindre jusqu'à 30 et 35 unités. Cependant, cette toxine peut perdre au cours de sa transformation en anatoxine une notable fraction de son pouvoir antigène.

Telle est, à l'heure présente et dans ses grandes lignes, la production des toxines diphtérique, tétanique et staphylococcique, production spécialement adoptée à l'obtention de quantités importantes d'anatoxine spécifique possédant une valeur antigène intrinsèque aussi élevée que possible.

Des essais sont effectués, depuis quelques années, à l'étranger comme en France, dans le but d'obtenir des toxines (diphtérique et staphylococcique, par exemple) en utilisant des milieux chimiquement définis. Très intéressants du point de vue théorique ces

essais n'ont pas encore abouti à des résultats permettant de substituer, avec des avantages certains, de tels milieux aux milieux usuels qui ont fait leurs preuves dans la production des toxines et partant des anatoxines.

LA MÉTHODE DE FLOCCULATION ET LE DOSAGE DES ANTIGÈNES DIPHTÉRIQUE TÉTANIQUE, STAPHYLOCOCCIQUE

par G. RAMON.

Les recherches sur la genèse, au cours de la culture, du poison microbien et de l'antigène qu'il représente ont été facilitées, au cours de ces quinze dernières années, par l'utilisation de la méthode de floculation.

De même, la floculation a grandement favorisé les progrès réalisés, ces derniers temps, dans la production des toxines de valeur antigène intrinsèque élevée et partant des anatoxines douées d'une activité immunisante puissante.

Il convient d'envisager séparément le dosage par la floculation des antigènes diphtérique, tétanique, staphylococcique, le terme antigène étant employé ici pour désigner les toxines et anatoxines.

ANTIGÈNE DIPHTÉRIQUE. — La technique du dosage de l'antigène diphtérique a été établie dès la découverte du phénomène de floculation dans les mélanges de sérum antidiphtérique et de toxine spécifique (1922). C'est d'ailleurs l'emploi de cette technique qui a permis de mettre en évidence l'anatoxine et sa valeur antigène intrinsèque, indicatrice de son pouvoir immunisant.

La réaction de floculation est actuellement en usage dans la plupart des laboratoires pour le dosage de l'antigène diphtérique. Elle est pratiquée au moyen d'un sérum étalon convenablement choisi et permettant d'obtenir une floculation rapide.

Elle fournit, dans ces conditions, des résultats réguliers et constants.

ANTIGÈNE TÉTANIQUE. — La méthode de floculation permettant de mesurer l'activité de l'antigène tétanique a été d'une mise au point relativement difficile. Cela tient en particulier à la présence dans le filtrat tétanique, en dehors de la toxine proprement dite, de un ou plusieurs antigènes signalés depuis longtemps (G. Ramon) et dont l'un d'eux a été récemment caractérisé (A. Prévot). Cela tient encore au sérum antitétanique qui peut contenir divers anticorps et dont l'antitoxine peut présenter des qualités diffé-

rentes qui dépendent en partie de l'animal qui l'a fournie (G. Ramon, E. Lemétayer, I. Pirotsky). Il en résulte des troubles plus ou moins fréquents dans la réaction de floculation : double ou triple zone de floculation avec floculation dite anormale ou paradoxale, etc. Il importe donc de choisir un sérum antitétanique étalon permettant d'éviter ces perturbations, lesquelles peuvent fausser les résultats. Après de nombreuses recherches, de tels sérums ont été récemment obtenus qui, au cours des nombreux dosages d'antigène tétanique effectués dans des toxines ou anatoxines d'origine variée ont fourni une floculation régulière apportant des résultats exacts.

ANTIGÈNE STAPHYLOCOCCIQUE. — La méthode de floculation que l'on utilise pour évaluer le pouvoir antigène de la toxine et de l'anatoxine staphylococcique est calquée sur celle employée pour le dosage des antigènes diphtérique et tétanique.

L'essentiel, ici encore, réside dans le choix du sérum antistaphylococcique étalon qui doit renfermer comme anticorps la seule antitoxine, spécifique de l'exo-toxine, afin d'éviter l'apparition d'une floculation « anormale » laquelle correspond à la réaction d'un antigène de nature protéinique (provenant vraisemblablement de l'autolyse du staphylocoque) et de son anticorps (G. Ramon et I. Pirotsky).

Concurremment à la méthode de floculation une autre méthode peut être utilisée *in vitro*. Elle repose sur la détermination du « pouvoir de combinaison » de l'antigène et de l'antitoxine avec comme indicateur l'hémolyse.

Ces deux méthodes fournissent des résultats en général concordants (G. Ramon et R. Richou).

Appliquées suivant des règles bien établies au moyen de sérums étalons convenablement choisis, les méthodes de floculation spécifique ont rendu et rendent à l'heure présente de grands services dans la mesure de la valeur antigène intrinsèque des toxines et anatoxines diphtérique, tétanique, staphylococcique.

SUR CERTAINES PARTICULARITÉS DE LA TOXINOGENÈSE DANS LES CULTURES DE STAPHYLOCOQUES

par G. RAMON et R. RICHOU.

Dans un milieu qui est spécialement adapté à la production de la toxine staphylococcique, l'élaboration de cette toxine est très variable suivant les souches de staphylocoques. Certains staphylocoques produisent une quantité de toxine si faible qu'elle est, avec nos techniques de dosage, inappréciable. Pour d'autres, la production de toxine est relativement considérable. Entre ces deux types extrêmes, il existe tous les intermédiaires.

Il ne semble pas y avoir de relation entre la *virulence* du staphylocoque et sa *propriété toxigène* (on peut, à cet égard, rapprocher le staphylocoque du bacille diphtérique ; on sait que, par exemple, le bacille diphtérique de Park et Williams est fort peu virulent et par contre très toxigène).

Une souche de staphylocoques, qui provoque une formation abondante de toxine dans un milieu déterminé, par exemple dans le bouillon de panse de porc, peut se montrer mauvaise productrice lorsqu'elle est ensemencée dans un autre milieu tel le bouillon à base de rate de veau.

Malgré d'assez nombreux essais effectués en utilisant des milieux divers additionnés de substances variées (G. Ramon et A. Berthelot), il n'a pas été possible, jusqu'ici, d'obtenir une production abondante de toxine staphylococcique sans avoir recours à la circulation dans les ballons de culture, du mélange d'air et d'acide carbonique que Burnet a été le premier à employer avec succès en ce domaine. Il y a donc là un facteur important de la toxinogénèse staphylococcique.

L'enrichissement du milieu de culture en toxine spécifique sous l'influence de la végétation du staphylocoque toxigène est relativement rapide si on le compare à celui dû au bacille diphtérique. Ainsi, l'apparition de la toxine staphylococcique peut être perçue dès la trentième heure après l'ensemencement, son élaboration atteint ordinairement son maximum vers le sixième ou septième jour.

La toxine staphylococcique se montre plus ou moins sensible à l'action du formol suivant qu'elle a été produite par telle ou telle souche végétant dans tel ou tel milieu.

Ces particularités et d'autres encore doivent retenir l'attention de l'expérimentateur chargé de la production de la toxine et de l'anatoxine staphylococcique.

PRODUCTION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE MILIEU DE CULTURE — SOUCHE TOXIGÈNE

(INSTITUT PASTEUR 1904-1938)

par G. LOISEAU et M. PHILIPPE.

I. MILIEU DE CULTURE. — 1° De 1904 à 1929, emploi exclusif du bouillon Martin (1898) composé d'un mélange à parties égales de *macération de viande fermentée* et des produits d'*hydrolyse pepsique des panses de porc* d'une durée de *quatorze heures*.

Par sélection des colonies les plus toxigènes de la souche Park et Williams n° 8 sur sérum coagulé, par l'augmentation de l'alcalinité du bouillon à pH 8 environ, par suppression du chauffage à 120°, la d. m. m., qui était de 1/200 de centimètre cube à 1/400, arrive à 1/1.200 et 1/1.400. Du mois d'août 1927 au mois de décembre 1929, la moyenne du titre de floculation des toxines fut de 11,7 unités.

L'emploi du glucose à la dose de 1 gr. 5 par litre permet d'obtenir des toxines aux environs de 13 unités.

2° A partir de 1929, *suppression de la fermentation de la macération de viande* et emploi systématique du glucose (G. Ramon, 1929) ; les premières fabrications en grande masse donnent des toxines d'une valeur moyenne de 10 unités ; la présence d'une plus grande quantité de matières réductrices dans la macération de viande, les résultats d'expériences sur de petits volumes montrent qu'il faut apporter un soin particulier dans la préparation du bouillon à base de viande non fermentée.

3° En 1930-1931, les seuls *perfectionnements matériels* apportés à l'hydrolyse pepsique des panses de porc nous permettent d'obtenir des toxines dont la moyenne, au cours de douze mois, est de 12,8 unités.

4° 1931-1932. Etude des effets du temps d'hydrolyse des panses de porc, *durée de la digestion portée à vingt-quatre heures* (350 grammes de hachis de panse par litre d'eau acidulée) ; résultats de juillet 1931 à septembre 1932 : 15,7 unités (G. Loiseau et M. Philippe).

5° Emploi des régulateurs de réaction et spécialement de l'acétate de soude (A. Berthelot et G. Ramon, 1925-1932) associé au glucose. Toxines produites de juin 1932 à mai 1934 : 21,4 unités.

6° 1932 à 1934. Augmentation de la proportion du *liquide d'hydrolyse pepsique des panses de porc* aux deux tiers du volume du bouillon, réduction de la *macération de viande* à un tiers, au lieu de parties égales (G. Loiseau et M. Philippe). Valeur moyenne des toxines obtenues d'octobre 1932 à août 1934 : 27 unités.

7° 1934 à 1938. *Réduction à 500 cent. cubes*, au lieu de 1.200, *du volume de bouillon mis en culture. Utilisation du maltose* associé au glucose et à l'acétate de soude (G. Loiseau et M. Philippe). Valeur moyenne des toxines : 35,8 unités.

II. SOUCHE TOXIGÈNE. — Il ne sera question, dans cette deuxième partie, que de la souche de bacille diphtérique Park et Williams n° 8, envoyée au Dr L. Martin en 1895 et conservée, depuis cette époque, au laboratoire de la Diphtérie.

L'*altération du pouvoir toxigène* peut se produire sur un milieu qui s'était montré favorable à l'entretien de la souche et à la production de toxine. Exemple rapporté par H. L. Wilcox en 1922 : la souche originale de Park et Williams n° 8, entretenue depuis 1895 jusqu'en 1914 sur bouillon à la peptone Witte, s'affaiblit progressivement de 1914 à 1916 et ne retrouve pas son pouvoir toxigène initial, même sur un milieu à la peptone Park Davis où la souche Institut Pasteur n° 8 produit des toxines tuant au 1/800 et au 1/1.500. Cette dernière origine, dans le milieu à la peptone Witte, voit également son pouvoir toxigène s'affaiblir.

Une autre cause d'altération du pouvoir toxigène réside dans les repiquages trop fréquents sur le milieu de conservation (Pappenheim Jun. et S. J. Johnson).

L'*adaptation d'une souche à un nouveau milieu* est envisagée de façons diverses par les auteurs. Pour H. L. Wilcox, il n'est pas nécessaire de faire de nombreux passages si le milieu est bien adapté à la production de toxine ; l'un de nous, avec G. Abt, a montré qu'un bacille diphtérique habitué à un bouillon de pH 7,8 à 8 peut être transporté dans des bouillons de pH 5,8 à 9 sans adaptation ; Hewlett, en 1930, assure que la culture doit être acclimatée au nouveau milieu ; pour A. M. Pappenheim Jun., il est inutile de poursuivre l'adaptation au nouveau milieu. Lors de la substitution du milieu à base de viande non fermentée (G. Ramon, 1929) au milieu Martin à base de viande fermentée, nous avons continué, pendant deux ans, les passages sur ces deux milieux ; il ne nous est pas apparu que la substitution d'un milieu à un autre ait pu nuire à l'entretien de la fonction toxigène.

L'examen de deux souches, poursuivi simultanément dans le même bouillon, montre qu'avec le temps il peut se produire insensiblement une dégradation de l'aptitude toxigène ; cette dégradation peut reconnaître une cause indépendante du milieu et de la souche (température trop élevée de l'étuve), mais semble également due à d'autres causes, peut-être à la rareté ou à l'excès de certains éléments du milieu plus nécessaires à certaines souches pour produire une toxine de haut pouvoir.

La conservation sur sérum coagulé ne met pas absolument à l'abri des variations du pouvoir toxique.

Pour essayer d'obtenir une meilleure stabilisation du pouvoir

toxigène, nous avons essayé, depuis plusieurs années, la conservation de la souche Park et Williams n° 8 par passage, *une fois par semaine*, dans de *petits ballons de bouillon* (150 cent. cubes) *recouvert d'une couche de 2 centimètres d'huile de vaseline*. Conservation en *anoxymbiose* opposée au mode habituel en *oxybioso*. Au cours de 24 essais simultanés, le nouveau procédé de conservation se montra supérieur à l'ancien, tant par la moyenne plus élevée des toxines obtenues que par l'obtention de plus hautes valeurs.

ESSAI DE STABILISATION DE LA FONCTION TOXIGÈNE DU BACILLE DIPHTÉRIQUE

par M. PHILIPPE.

Pasteur avait envisagé la « fermentation comme une conséquence obligée de la manifestation de la vie » quand elle s'accomplit « en dehors des combustions directes dues au gaz oxygène libre » (1), puis, plus loin, envisageant les deux modes de vie de *Mycoderma vini*, il précise qu'« il n'y a qu'une différence qui est irrécusable : dans un cas, la vie de la plante a lieu au niveau du liquide, en présence d'air atmosphérique ou mieux de gaz oxygène, c'est précisément pourquoi il est plus explicite d'employer le mot oxybioso au lieu d'aérobioso, l'antonyme étant anoxymbioso au lieu d'anaérobioso, tandis que dans l'autre elle s'accomplit hors de son influence, ou du moins au contact d'une quantité d'oxygène extrêmement faible... »

Armand Gautier ayant constaté que les produits oxygénés excrétés par l'organisme animal proviennent du dédoublement direct des tissus et des aliments consommés sans intervention aucune d'oxygène libre, puis, dans le bilan de ce gaz absorbé par les poumons et celui contenu dans les excréta, respiration comprise, que le rejet de l'oxygène surpasse d'environ un cinquième celui absorbé, il en conclut que le cinquième du fonctionnement animal se fait par fermentations directes par suite de dédoublements ou d'hydratations anaérobies (2). Les expériences d'Armand Gautier mettent en évidence « le fonctionnement général anoxybiotique, sans aucune spécificité, puisqu'il est propre à tout tissu vivant et qu'on peut même obliger chacune de nos cellules à fonctionner et à vivre sous la forme anaérobie ».

(1) L. PASTEUR, *C. R. Acad. Sc.*, **75**, 7 octobre 1872, p. 784.

(2) A. GAUTIER, *Lettre à la Gazette hebdomadaire de Médecine*, 1^{er} juillet 1881, et *La Chimie de la cellule vivante* (Encyclopédie des aide-mémoire Léauté), Masson édit., Paris.

J'ai été amené à envisager ces considérations en étudiant le bacille diphtérique, qualifié d'anaérobie facultatif, du fait qu'il cultive dans toute la hauteur de la gélose de Veillon, milieu dans lequel il ne peut emprunter l'oxygène qui lui est nécessaire qu'aux dépens des matériaux de ce milieu de culture.

Utilisant non plus un milieu solide, mais liquide (bouillon), j'ai constaté que le bacille diphtérique cultivait normalement, formant un voile, lorsqu'on l'isolait du contact de l'air par une couche suffisamment épaisse d'huile de vaseline, le voile se formant à l'interface. Le voile, vu au travers de la couche huileuse, apparaît mat, chagriné et uni, ce qui le différencie de celui formé au contact de l'air qui est fragile, scissuré, lisse, gras, onctueux, diaphane. Tandis que dans le premier cas le voile, solidement maintenu à l'interface, n'abandonne lentement qu'un fin dépôt pulvérulent de corps microbiens, celui qui se forme au contact direct de l'air laisse progressivement tomber au fond du vase des lambeaux plus ou moins grands. Le bacille diphtérique ainsi conservé sous huile de vaseline se conserve très longtemps (plus de dix-huit mois en l'état actuel de nos constatations) sans aucun repiquage, alors qu'en culture aérobie sa vitalité cesse après quelques jours si l'on n'a pas soin de le repiquer toutes les quarante-huit-soixante-douze heures.

Dans un travail antérieur au mien, Truche (3) a fait d'analogues constatations, mais ne parle pas du bacille de Loeffler. J'ai nommé ce phénomène « hypoxybiose » (4), m'appuyant pour cela sur les travaux de Pasteur et d'A. Gautier, ainsi que sur la constatation que j'ai faite de l'existence constante d'une faible quantité de toxine (1.10^{-1} à 1.10^{-2}) qui ne peut prendre naissance qu'en empruntant l'oxygène nécessaire à sa production au milieu même.

TECHNIQUE ACTUELLE DE LA PRÉPARATION DES SOUCHES QUI SERVENT DE SEMENCE POUR L'OBTENTION DE LA TOXINE. — La souche est repiquée toutes les semaines (actuellement 350^e passage de la colonie originelle) dans du bouillon frais sans addition d'acétate sodique ni de glucides. Dès que la culture est obtenue (vingt-quatre heures et même beaucoup moins), je la fixe, en l'isolant, sur du sérum coagulé également recouvert d'huile de vaseline. La culture, qui se fait comme dans les conditions ordinaires, une fois amorcée, on scelle le tube qui est conservé à l'obscurité et à la température ordinaire. Pour utiliser la souche ainsi obtenue, on prélève une colonie que l'on transfère dans un tube de bouillon surmonté d'une couche d'huile de vaseline d'au moins 1 centimètre d'épaisseur. Après vingt-quatre heures, le voile s'étant formé, on retire délicatement l'huile et en roulant vivement le tube entre les mains on

(3) C. TRUCHE. *Ces Annales*, **38**, 1924, p. 516.

(4) M. PHILIPPE, *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 1937, p. 170.

émulsionne le voile (on obtient très facilement une émulsion très fine), qui est à son tour reportée dans un petit ballon dit d'ensemencement, contenant 200 cent. cubes environ de bouillon *pur*. Après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve, on obtient un voile abondant, exubérant, qui, après sa répartition par agitation dans le bouillon, sert de culture de semence.

L'ENDO-ANATOXINE TYPHIQUE ET SES APPLICATIONS DANS LA VACCINATION ET LA SÉROTHÉRAPIE ANTI-TYPHIQUES

par E. GRASSET.

(Institut de Recherches médicales de l'Afrique du Sud.)

Des recherches commencées en 1926 sur les dérivés antigéniques des bacilles typho-paratyphiques, nous montrèrent qu'en soumettant des émulsions concentrées chauffées à 58°, de bacilles typhiques, de pouvoir antigénique sélectionné (type « Vi ») à un procédé d'extraction par congélations répétées on obtient un produit soluble contenant les principes antigéniques de l'émulsion originale. Par l'action combinée du formol (5 p. 1.000) et de la chaleur, on obtient, après six semaines à 38°, un antigène atoxique, ayant conservé néanmoins ses propriétés antigéniques originelles. Ce nouveau type d'antigène « endo-analoxine typhique », comme nous l'avons désigné (ou endotoxoïd, selon la nomenclature anglo-saxonne), confère à l'animal d'expérience, tel que la souris, une haute protection envers l'injection d'épreuve, intra-péritonéale, de doses mortelles multiples de bacilles typhiques de type « Vi » ou « O ».

Des vaccinations humaines, effectuées dès 1933, montrèrent que l'endo-anatoxine typhique peut être injectée sans inconvénient chez des sujets de tout âge, depuis le nourrisson, l'adulte, jusqu'au vieillard de quatre-vingts ans. Les réactions bénignes, observées chez une faible proportion de sujets, ne sont que rarement accompagnées (moins de 1 p. 100) d'une élévation de température ne dépassant qu'exceptionnellement 38°.

Les statistiques portant sur plusieurs centaines de mille de mineurs du Transvaal sont unanimes à souligner l'incidence exceptionnelle des réactions vaccinales ne nécessitant aucune interruption de travail. De 1933 à 1938, près de 500.000 sujets ont été vaccinés par l'endo-anatoxine typhique en Afrique du Sud et dans diverses colonies anglaises et portugaises dont environ 350.000 dans les mines d'or du Rand. Les statistiques, relatives

à la vaccination de 152.000 mineurs, de 1934 à 1936, montrent une chute considérable de l'incidence et mortalité typhiques, soit respectivement de 1,13 et 0,23 p. 1.000, par rapport aux années précédentes. Une morbidité et mortalité environ 7 fois supérieures furent observées dans un groupe de 77.000 mineurs vaccinés par voie buccale durant la même période. L'endo-anatoxine a été recommandée et introduite par les autorités sanitaires gouvernementales dans de nombreuses villes et districts ruraux, collectivités européennes et indigènes, travaux publics et d'irrigation, prisons, écoles, orphelinats, etc.

C'est ainsi qu'une expérience comparative, sur une population de 20.000 indigènes, parmi lesquels 4.357 furent vaccinés par l'endo-anatoxine typhique, montra une incidence de typhoïde plus de 10 fois inférieure chez les sujets vaccinés, et mortalité nulle, par comparaison aux sujets non immunisés et dont la mortalité s'éleva à 1,05 p. 1.000.

L'ensemble des statistiques montre que partout où la vaccination par l'endo-anatoxine typhique a été introduite la morbidité et la mortalité par typhoïde sont tombées dans des proportions considérables.

La haute et rapide immunité, conférée par l'endo-anatoxine typhique, est aussi démontrée par la présence chez les sujets vaccinés, d'agglutinines antityphiques H et O, à titre élevé, atteignant respectivement 1/3.000 et 1/800, dix jours après une première injection d'endo-anatoxine et 1/10.000 «H» et 1/5.000 «O», avec l'endo-anatoxine concentrée.

Par précipitation par l'alcool absolu, il est possible d'extraire de l'endotoxine et de l'endo-anatoxine obtenues par ce procédé, un antigène purifié, et qui, après redissolution, confère à la souris et au lapin un degré de protection, et stimule la formation d'agglutinines, à des taux comparables à ceux résultant de l'injection des antigènes originels.

Par ailleurs, l'endo-anatoxine typhique a été utilisée dès 1928 pour la préparation d'un sérum anti-typhique doué de propriétés anti-bactériennes et anti-toxiques, sérum utilisé dans le traitement de plus de 3.500 cas de fièvre typhoïde.

Les statistiques portant sur de nombreuses séries de cas traités par le sérum, montrent une réduction globale de la mortalité de plus de 50 p. 100, par rapport à celle des sujets non soumis au traitement sérothérapique.

M. Weinberg. — Je serais obligé à M. Grasset de me dire comment il titre son sérum antityphoïdique et quel est le titre le plus actif qu'il a obtenu.

M. Grasset. — Le titrage du sérum antityphoïdique que nous préparons actuellement est effectué par rapport à son contenu en

anticorps Vi et O, respectivement par la détermination de leur taux en agglutinines spécifiques et par l'épreuve de protection sur la souris, en injectant des groupes de souris avec une dose de sérum à examiner et faisant suivre cette injection, dix-huit heures plus tard, de l'injection intrapéritonéale d'épreuve de doses mortelles multiples de bacilles virulents de type Vi, dans le cas du titrage de l'anticorps Vi ; en ce qui concerne l'anticorps O, de doses mortelles multiples de bacilles typhiques O, telles que 0 gr. 01, ou de doses mortelles multiples d'endotoxine soluble, ou encore de bacilles typhiques tués par la chaleur.

Le titre agglutinant de ce sérum atteint 1/100.000 pour l'agglutinine anti-O, et 1/3.000 pour l'agglutinine anti-Vi.

Le pouvoir protecteur chez la souris atteint, pour 1 cent. cube de sérum, 10 doses mortelles pour le bacille typhique de type Vi ; pour le pouvoir protecteur anti-O, c'est-à-dire anti-endotoxique, il atteint 5 doses mortelles, dose au-dessus de laquelle les résultats sont irréguliers. Le sérum possède donc des pouvoirs anti-infectieux et anti-endotoxique de titres élevés.

L'ÉTAT RÉFRACTAIRE DES COBAYES, *POST PARTUM*, VIS-A-VIS DES TOXINES TÉTANIQUE ET DIPHTÉRIQUE INTRODUITES PAR VOIE VAGINALE

par P. NÉLIS et E. LAGRANGE.

*(Laboratoire Central de l'Administration de l'Hygiène,
Bruxelles)*

Lorsque, à une série de cobayes, on introduit, dans la cavité vaginale, des doses diverses de toxine tétanique, on constate qu'à partir de 50 doses minima mortelles, on détermine la mort de l'animal par tétanos, en quatre à cinq jours, ou dans un temps plus court, si la dose instillée est plus forte (100 à 250 doses minima mortelles : mort en deux jours).

Or, si on introduit, par la même voie, des quantités de toxine tétanique allant de 50 à 5.000 doses mortelles, chez des cobayes qui ont mis bas depuis moins de trois jours, on constate que ces animaux supportent ces doses énormes sans le moindre inconvénient.

Nous avons obtenu des résultats analogues en utilisant la toxine diphtérique : alors que les témoins meurent d'intoxication diphtérique, par instillation vaginale de 0,05 cent. cubes d'une toxine très active, les mères, après le part, résistent à des doses au moins dix fois plus fortes. En vue de préciser le déterminisme

de cet état remarquable, nous avons réalisé une série d'expériences qui nous ont permis de faire les constatations suivantes :

1° *Le phénomène est de courte durée. Il est lié à la mise bas et non à l'état de gestation.*

L'état réfractaire se manifeste aussitôt après la mise bas ; il persiste de trois à quatre jours, puis il disparaît sans laisser de traces. Une mère qui, après le part, supporte 1.000 doses mortelles de toxine tétanique instillée par voie vaginale, succombe au tétanos lorsqu'on lui instille, par la même voie, 50 doses de toxine, cinq à huit jours après la première instillation. Quelques jours avant la mise bas, le cobaye est aussi sensible que les témoins. La mise bas de petits prématurés détermine l'apparition de l'état réfractaire.

2° *La résistance des cobayes, après le part, est due à un état réfractaire local et non général.*

a) Si, à une mère, on inocule, sous la peau, pendant la période réfractaire, une seule dose mortelle de toxine tétanique, elle succombe comme un animal neuf.

b) Le sérum d'un cobaye, prélevé pendant la période réfractaire, ne possède aucune propriété « neutralisante » ou « antitoxique » *in vitro*.

3° *Les essais entrepris en vue de reproduire le phénomène in vitro ont échoué jusqu'ici.*

Les mélanges effectués *in vitro*, au moyen de petites quantités de toxine tétanique, d'une part, et d'exsudat vaginal de la mère ou de liquide amniotique, ou d'extraits aqueux de cotylédons, de pulpe vaginale, de pulpe utérine d'autre part, se sont toujours montrés toxiques lorsqu'on les réinjecte sous la peau de cobayes neufs.

4° *L'état réfractaire de l'animal, après le part, paraît lié à une disparition rapide de la toxine instillée.*

Si, après instillation vaginale d'une forte quantité de toxine tétanique, on opère des prélèvements successifs dans le vagin, on constate habituellement que la disparition de la toxine instillée est plus rapide chez les mères que chez les témoins.

Prof. G. Dubreuil. — MM Nélis et Lagrange ont-ils tenu compte, dans leurs expériences, des modifications de la structure de la muqueuse vaginale des cobayes au cours du cycle œstrien et dans le post-partum ? Le changement très profond de structure de l'épithélium peut avoir une influence considérable sur la faculté d'absorption de cette muqueuse vis-à-vis des toxines.

Prof. Renaux rappelle que des auteurs allemands ont introduit chez des femmes, immédiatement avant l'accouchement, des tampons imbibés de cultures streptococciques, et que cette expérience n'a pas été suivie de pénétration du streptocoque dans

l'organisme, phénomène qu'il faut peut-être rapprocher de celui signalé par M. Nélis

Prof. **Lisbonne.** — Cette sorte d'immunité s'étend-elle aux cornes utérines ?

M. **Max Vandestrade.** — Suite à la communication très intéressante de M. Nélis et aux observations formulées par M. Renaux, ne peut-on admettre l'hypothèse de l'apparition d'un état particulier de défense ou de résistance à l'absorption de toxines au niveau de la muqueuse vaginale de la femme au moment de l'accouchement ? La non-apparition de cet état chez certaines femmes pourrait être la cause des infections streptococciques observées après l'accouchement ou l'avortement.

TROISIÈME SÉANCE

SÉANCE CONSACRÉE A LA CHIMIOTHÉRAPIE DES INFECTIONS MICROBIENNES

INTRODUCTION

L'ÉVOLUTION DE LA CHIMIOTHÉRAPIE ANTIBACTÉRIENNE

par E. FOURNEAU.

Si on s'accorde, et à juste titre, pour reconnaître en Ehrlich le véritable fondateur de la chimiothérapie, c'est parce qu'il en a donné une définition précise, en a formulé les lois, décrit les méthodes, et surtout parce que, le premier, il a réussi à guérir définitivement un animal infecté expérimentalement en lui injectant une substance chimique choisie parmi une centaine d'autres.

Cependant, les essais pour atteindre électivement les parasites introduits dans la circulation d'un animal datent des premiers jours de l'ère pastorienne. Dès qu'on se fut rendu compte que des micro-organismes provoquaient des maladies infectieuses, qu'on pouvait les isoler, les cultiver dans des milieux appropriés, les injecter à des animaux neufs pour leur communiquer une maladie identique à celle dont ils provenaient, et enfin qu'il était possible d'empêcher le développement des cultures, et même de tuer les microbes avec des produits chimiques employés en quantité extrêmement faible, on eut l'idée d'essayer l'effet de ces substances chimiques sur des animaux malades. C'est ainsi, en somme, qu'est née la chimiothérapie, et il est permis d'associer au nom d'Ehrlich ceux de Chamberland, de Koch, de Behring, de Mesnil, de Nicolle, etc.

Jusqu'à ces tout derniers temps la chimiothérapie des maladies microbiennes n'avait donné que des déceptions, et on en comprend maintenant les raisons. Les premiers essais avaient surtout porté sur des antiseptiques minéraux tels que le sublimé, sur le phénol, les essences. Ces substances n'avaient pas d'affinité particulière pour les microbes, ou du moins elles étaient des poisons de toutes les cellules et elles justifiaient parfaitement ainsi cette phrase assez décourageante de Behring :

« On peut considérer comme une loi que les tissus et les cellules de l'organisme de l'homme et des animaux sont plus sensibles vis-à-vis de l'action toxique des désinfectants que n'importe quelle bactérie connue. Aussi, avant qu'un antiseptique ait des chances de tuer des bactéries ou d'inhiber leur croissance dans le sang ou les organes, l'animal lui-même est tué. Le pessimisme de ceux qui déclarent que la désinfection dans un organisme vivant est à jamais impossible n'est que trop justifié. »

A la lumière des travaux récents, cette phrase rappelle celle que prononçait Velpeau quelques mois avant la découverte de l'anesthésie quand il disait que la suppression de la douleur au cours d'une opération était une chimère qu'il n'était pas permis de poursuivre.

Il fallait donc, avant tout, trouver des produits chimiques se fixant électivement sur les bactéries. Or, quelques années après que Behring eut ainsi manifesté son découragement, Ehrlich, injectant un dérivé d'arsenic trivalent à un animal infecté expérimentalement par des trypanosomes, réussissait à l'en débarrasser et à sauver l'animal. On pouvait donc atteindre un parasite, une cellule étrangère au corps de l'animal sans incommoder ce dernier. Ce qu'Ehrlich avait pu réaliser chez la souris pour une infection due à des protozoaires, devait être possible pour toutes les infections : chez le rat, le cobaye, le lapin, chez les grands animaux, chez l'homme.

Pendant quelque temps, cependant, on a cherché des antiseptiques de plus en plus puissants *in vitro* avec l'espoir d'en trouver un tellement actif que, même en le répandant dans le corps de l'animal à une dilution extrême, il détruirait les microbes qui y sont contenus. Cela impliquait forcément — Ehrlich l'avait dit au début de ses recherches — une extrême diffusibilité ; cela nécessitait également des études sur la répartition des médicaments, et comme il était difficile, chez les petits animaux de laboratoire, de doser dans les organes d'une manière quantitative de très faibles traces de médicaments, il était tout naturel de faire des essais avec des matières colorantes dont la répartition dans l'organisme est facile à voir, tout au moins quand elles ne sont pas réduites, et par conséquent, décolorées.

Or, les travaux de Pasteur, de Koch, sur la coloration des bactéries, ceux d'Ehrlich, de Goldman, de Schuleman, sur la coloration des tissus, mettaient au premier plan la notion de spécificité. Déjà, avec les matières colorantes on avait observé des faits très intéressants, surtout dans le domaine de la coloration *in vivo* des tissus, en relation étroite avec la constitution des couleurs. Ehrlich même avait découvert une matière colorante dérivée de l'oxazine, qui colorait *in vivo* certaines parties des trypanosomes à l'exclusion de tout le reste de la cellule. C'était là une preuve apparente vraiment remarquable de spécificité qui, en même

temps, donnait, dans une certaine mesure, raison aux théories d'Ehrlich sur l'action directe des médicaments.

Un premier point était donc bien établi : il était possible d'atteindre les microbes dans le corps d'un animal sans trop endommager ce dernier. C'était une première forme de spécificité, mais il y en a une autre, et un grand progrès a été réalisé par Bechhold et Ehrlich quand ils ont montré qu'en parlant d'une substance donnée, du crésol par exemple, ou du naphthol, on pouvait non seulement augmenter très notablement l'action antiseptique par l'addition d'atomes d'halogène dans la molécule, mais encore que les substances halogénées ainsi obtenues n'avaient pas la même action sur tous les microbes. C'est ainsi, par exemple, que sur le bacille diphtérique le tétrabromonaphthol est 250 fois plus actif que sur le paratypique B.

Cette notion de spécificité prend un caractère encore plus précis à la suite des travaux de Browning, de Morgenroth et de Fleming sur les dérivés de l'acridine, de l'hydroquinine. La trypaflavine, en particulier, empêche le développement d'une culture de streptocoque à la dose de un millionième ; par contre, elle n'agit pour ainsi dire pas sur le colibacille, et encore moins sur le *B. proteus*. Pour tuer en vingt-quatre heures des cultures, en bouillon, de gonococques, il suffit d'une concentration de trypaflavine variant de 1 p. 300.000 à 1 p. 30 millions ; pour le staphylocoque, il faut des concentrations de 1 p. 10.000.

Je pourrais multiplier les exemples, mais je citerai encore deux couleurs à cause de leur puissante action *in vitro* et de leur spécificité. Le violet dahlia, qui agit à la dose de 1 p. 800.000 sur le staphylocoque et n'a presque pas d'action sur le bacille typhique, et le vert brillant, qui agit sur le charbon à la dose de 1 p. 10 millions, tandis que pour le staphylocoque il faut atteindre la concentration de 1 p. 400.000.

En même temps que l'on précisait les phénomènes de spécificité, on se rendait compte de plus en plus de l'insuffisance des essais dans les cultures en l'absence de tout élément rappelant de près ou de loin l'organisme animal.

Un des premiers, Mueller, montra la différence d'action des matières colorantes sur certaines bactéries en présence ou non de tissus animaux. C'est ainsi qu'il constata qu'en ajoutant aux milieux nutritifs une bouillie d'embryons de poulets, il fallait employer bien plus de matière colorante pour obtenir la stérilisation des cultures. Et déjà il note que dans certains cas la différence est très faible, comme avec le bleu de nuit, par exemple.

Les études les plus systématiques sont dues à Browning, qui a fait faire un pas en avant à la question des antiseptiques en montrant d'une façon définitive qu'en présence de sérum l'action de la plupart des antiseptiques était notablement diminuée. Par contre, quelques-uns, en petit nombre, gardaient leur pouvoir antiseptique

et ce dernier était même augmenté : tel était le cas pour la trypaflavine, le rivanol.

Il ne faudrait pas cependant attacher une importance exagérée à ces différences et abandonner les essais *in vitro* dans des bouillons de culture, même sans sérum. Il est évident que si on trouvait une substance agissant à la dose de 1 p. 100 millions, dans un bouillon, et seulement à la dose de 1 p. 1 million, en présence de sérum, il s'agirait là d'un produit très intéressant. Il n'est pas interdit de croire, malgré l'expérience du prontosil dont nous parlerons tout à l'heure, qu'on trouvera des substances extrêmement antiseptiques *in vitro*, qui seront également très actives *in vivo*. L'essai *in vitro* est une des méthodes de chimiothérapie qu'on ne doit nullement abandonner ; elle n'est pas suffisante, c'est bien entendu, mais elle a sa place, sans compter qu'elle est en quelque sorte un délassement nécessaire.

Quoi qu'il en soit, c'est à la suite des travaux de Morgenroth et Browning qu'on a repris les essais *in vivo* qui avaient été entrepris auparavant d'une façon systématique par Schimmelbusch sur les plaies infectées. Morgenroth fit ses premiers essais, d'abord sur les infections localisées, puis sur les infections généralisées. Ils ne furent pas tout à fait négatifs, pas plus que ceux de Browning. Seulement, à cette époque, tous les éléments du succès n'étaient pas rassemblés comme ils le sont maintenant, et il est probable que les souches microbiennes qui servaient aux expériences n'étaient pas convenables. Comme on l'a constaté plus tard, la qualité, l'origine, la virulence des souches ont une importance capitale.

Je passe rapidement sur d'autres travaux cependant bien intéressants, en particulier sur ceux de Jacobs et Heidelberger sur les dérivés de la quinine où, pour la première fois, on voit apparaître l'aminophénylsulfamide, diazoté avec l'hydrocupréine. Jacobs et Heidelberger ont été très près de la grande découverte, car leur azoïque — on s'en est rendu compte plus tard — agit sur les streptocoques.

Je passe également sur les travaux qui ont conduit Léonard à l'hexylrésorcine qui occupe, à côté du mandélium, et des nouveaux antiseptiques de la série de l'aminophénylsulfamide, une place importante dans le traitement de certaines infections urinaires. Le mercurochrome, dérivé de la bromofluorescéine, est également très employé ainsi que des dérivés de l'hexaméthylènetétramine, le pyridium, etc.

Cette première période dans l'histoire de la chimiothérapie des maladies bactériennes ne fut donc pas sans laisser des traces durables, aussi bien en fixant des techniques nouvelles qu'en dotant la thérapeutique de substances intéressantes.

Comme cela arrive souvent avec les médicaments, on a trouvé à la trypaflavine, au rivanol, des emplois qui n'étaient pas prévus.

C'est ainsi que le rivanol est un excellent remède de la dysenterie amibienne ; la gonacrine, des infections à piroplasmes et de la fièvre ondulante.

Et j'arrive à la sensationnelle découverte de Domagk, laquelle, comme celle de l'anesthésie, a ouvert une ère nouvelle dans la thérapeutique. G. Domagk publia, le 15 février 1935, sous le titre : « Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen », les premiers résultats des recherches expérimentales poursuivies avec une substance nouvelle, la sulfamidochrysoïdine, ou *Prontosil*, née en 1932 du travail des chimistes Mietzsch et Klarer, dans les laboratoires de l'I. G. Farbenindustrie. Cette substance possède une action élective sur l'infection de la souris par le streptocoque hémolytique virulent et agit également dans l'infection chronique streptococcique du lapin et dans la staphylococcie du même animal. Ainsi qu'on l'observe pour maints agents thérapeutiques, le *Prontosil* n'exerce son action sur les streptocoques que dans l'organisme vivant, il n'agit pas *in vitro*.

Le 23 novembre 1935, M. et M^{me} J. Tréfouël, MM. F. Nitti et D. Bovet publiaient une première note intitulée : « L'action du *p*-aminophénylsulfamide sur les infections streptococciques expérimentales ». Ils émettaient l'hypothèse que l'activité de la sulfamidochrysoïdine, ou *Prontosil*, et d'autres dérivés résultant de la copulation du diazoïque de l'aminophénylsulfamide avec des mono- et des poly-phénols alcoylés ou non, provient de ce qu'ils « subsistent dans l'organisme une série de modifications dont le premier terme serait la coupure de la double liaison avec formation d'aminophénylsulfamide ». Leur hypothèse est basée sur le fait suivant : dans un azoïque, il y a deux molécules associées par l'azote ; or, les modifications chimiques du *Prontosil*, quand elles portaient sur une des deux parties de la molécule, ne paraissaient pas avoir une influence très grande sur l'action antiseptique ; par contre, toutes les modifications à l'autre partie se traduisaient par une disparition presque totale du pouvoir antistreptococcique. Il paraissait donc évident que le noyau essentiel de la molécule était celui qu'on ne pouvait toucher sans altérer profondément les propriétés de la molécule entière. Comme les azoïques de la série du *Prontosil* se réduisent très facilement dans l'organisme, il était naturel de penser que, dans le *Prontosil*, une seule partie était active. Cette partie est justement : l'aminophénylsulfamide qui fut immédiatement essayée sur l'infection streptococcique de la souris, et c'est ainsi que M. et M^{me} J. Tréfouël, Nitti et Bovet mirent en évidence l'activité de cette substance (Voir la formule à la fin de cette conférence).

Il se trouvait donc démontré que l'action des substances antistreptococciques de la famille du *Prontosil* n'était pas liée aux propriétés colorantes que leur conférait leur fonction azoïque, et

que, dans tous les cas, la partie aminophénylsulfamide joue un rôle important.

Un domaine nouveau de la chimiothérapie antibactérienne par des dérivés organiques, de constitution relativement très simple, se trouvait ouvert de ce fait. A cette série de dérivés sulfamidés, dont les applications cliniques se sont montrées déjà nombreuses et fécondes, est venu se rattacher depuis un autre groupe de dérivés organiques, dérivés du soufre, celui des phénylsulfones (dont l'action a été découverte simultanément par Buttle [1937], dans le laboratoire de M. Salimbeni et dans le mien). L'un d'eux est le Rodilone ; nous en parlerons tout à l'heure.

Partant du phénylaminosulfamide, E. Fourneau, M. et M^{me} J. Tréfouël, Nitti et Bovet publiaient, le 16 mai 1936, une note préliminaire contenant l'essentiel d'un article ultérieurement paru dans ces *Annales*, sur l'activité des dérivés du *p*-aminophénylsulfamide. Les rapports entre la structure chimique et l'activité des dérivés étudiés y sont envisagés. J'en retiens seulement ceci : seul l'isomère *p*-aminophénylsulfamide s'est montré actif ; les dérivés ortho et méta sont dépourvus d'efficacité.

Les recherches expérimentales sur l'action du 1162 F ont confirmé les premiers résultats de M. et M^{me} J. Tréfouël et de leurs collaborateurs. Citons en particulier les publications de Goissedet, Colebrooke, Buttle (1936), Long, Mellon, Rosenthal, Gross, Raiziss (1937), etc.

En ce qui concerne le mode d'action du *p*-aminophénylsulfamide, les premiers résultats positifs ont été rapportés le 13 juin par E. Fourneau, M. et M^{me} J. Tréfouël, Nitti et Bovet, qui décrivaient l'action du 1162 F sur les moisissures et même sur la germination des végétaux supérieurs. Ils concluaient que l'action empêchante était en rapport étroit avec la constitution de la molécule, et variait parallèlement avec l'activité des différents dérivés dans l'infection streptococcique. Cette première démonstration de l'action directe de l'aminophénylsulfamide était bientôt suivie des travaux de Colebrook, Buttle et O'Meara, où l'action *in vitro* du 1162 F sur le streptocoque était mise en évidence en bouillon de culture et dans le sang.

Nitti, Bovet et M^{lle} F. Depierre confirmaient leurs résultats et montraient le parallélisme qui existe entre l'activité thérapeutique des phénylsulfamides *in vivo* et leur action bactériostatique *in vitro*.

Une série d'arguments nouveaux ont permis de vérifier l'hypothèse de Tréfouël sur le mode d'action de la sulfamidochrysoidine et sa réduction dans l'organisme avec libération du *p*-aminophénylsulfamide. Fuller (1937), puis Marshall (1937) ont pu isoler et doser l'aminophénylsulfamide dans le sang, le liquide céphalo-rachidien et l'urine des animaux ayant reçu du prontosil. Paral-

lèlement à ce fait, le sang (Colebrook, 1936) et l'urine (Kenny, Johnston et v. Haebler, 1937) d'animaux traités par le Prontosil acquièrent des propriétés bactéricides.

Tout comme le prontosil, le *p*-aminophénylsulfamide est actif, non seulement sur le streptocoque, mais également sur le méningocoque (Buttle, 1936 ; Proom et Buttle, 1937 ; Rosenthal, 1937), sur le pneumocoque (Rosenthal, 1937) et sur une série d'autres germes tels que le bacille typhique, *p*-typhique, aerttrycke et les *Pasteurella* (Buttle, Parish, Mc Leod et Stephenson, 1937).

Les premiers essais cliniques du 1162 F ont été faits par Colebrook (1936) qui a signalé son action dans l'érysipèle et la fièvre puerpérale. Parmi les autres travaux cliniques importants, on peut citer ceux de Long, Foulis et Barr, René Martin, Debré, Armand-Delille, Robert Tiffeneau, etc., qui ont utilisé l'aminophénylsulfamide avec succès surtout dans les méningites à streptocoques et à méningocoques ; ceux de Bohlan (1937) sur la gangrène gazeuse ; ceux de Kenny sur la colibacillose, de Hérold, Dees et Colston, de Durel, de Palazzoli, sur la blennorragie, ceux de Ballon, etc.

Rich et Follis ont publié un travail sur la chimiothérapie de la tuberculose par le sulfanilamide qui autorise l'espoir d'atteindre aussi cette redoutable maladie par des substances chimiques voisines.

Ce qui caractérise l'aminophénylsulfamide, c'est sa grande diffusibilité ; elle est telle que ce produit pénètre dans le liquide céphalo-rachidien et y porte ainsi son action antiseptique.

Une autre particularité c'est que, mélangé avec du sang, il exerce sur les streptocoques une action bactéricide notablement plus grande que dans un bouillon de culture. Il exalte donc les propriétés bactéricides naturelles du sang et répond ainsi à ce qu'on doit attendre d'un antiseptique.

D'après R.-L. Mayer, le sulfamide serait transformé dans l'organisme en hydroxylaminophénylsulfamide. Cette hypothèse, basée sur l'action bactéricide plus forte de ce dernier produit *in vitro*, est assez difficile à étayer par des expériences *in vivo* à cause de l'instabilité de la fonction hydroxylamine.

Une exaltation de la phagocytose, provoquée par une excitation des leucocytes par l'aminophénylsulfamide, a été soutenue par Levaditi. Elle est évidemment possible, mais il paraît également difficile de la mettre en évidence, la phagocytose pouvant être facilitée, non seulement par l'excitation des leucocytes, mais par l'affaiblissement des microbes.

Enfin, ni la splénectomie, ni le blocage du système réticulo-endothélial n'affectent l'action protectrice de l'aminophénylsulfamide, ce qui tend à prouver son invraisemblable indifférence vis-à-vis des tissus et du contenu des cellules les plus variées.

Un travail très intéressant de L. K. Wolf, étendant les résultats

d'Osgood sur les cultures de tissus, montre que le sulfamide n'en altère nullement le développement, et c'est là une constatation très importante eu égard à l'extrême sensibilité de ces cultures.

Les dérivés azoïques ne sont pas actifs *in vitro*, mais ils le deviennent en présence de cystéine qui les réduit, et c'est vraisemblablement sous l'influence de substances réductrices identiques ou analogues à la cystéine que les azoïques se transforment en médicament directement actif sur les microbes, ce qui n'exclut du reste pas un autre mécanisme d'action.

En résumé, l'action directe de l'aminophénylsulfamide est parfaitement admissible pour les raisons suivantes :

- 1° Le médicament agit *in vitro* ;
- 2° Il exalte le pouvoir bactéricide du sang ;
- 3° Il existe un parallélisme étroit entre l'action microbicide du sang et les quantités de sulfamide contenu dans ce dernier ;
- 4° Enfin, l'état réfractaire vis-à-vis des streptocoques disparaît aussitôt que le sulfamide lui-même a disparu de la circulation sanguine.

Les recherches ont été étendues à des séries nouvelles.

Dans la famille des azoïques, en dehors du Prontosil, il faut également citer le Rubiazol-C (le premier Rubiazol n'étant pas autre chose que la marque française du Prontosil). Le Rubiazol-C possède une fonction carboxylée ; il est dû à André Girard, il aurait un certain avantage sur le Prontosil grâce à sa solubilité, et à ce qu'il ne provoquerait pas de phénomènes allergiques à cause de l'adjonction d'une fonction carboxylée.

Aucun autre produit préconisé depuis ne possède la fonction azoïque, ce qui montre, soit dit en passant, que malgré les critiques adressées, surtout du côté français, aux idées de Tréfouël, on a suivi la même voie que lui, du moins jusqu'à présent. Goissedet et ses collaborateurs ont découvert le benzylamino-3-benzol-sulfonamide, connu sous le nom de *Septazine*. C'est un produit très maniable mais dont l'action est moins étendue que celle de l'aminosulfamide.

Enfin les deux derniers venus dans la même série sont l'Uliron et le Dagénan.

L'Uliron fait partie d'amides complexes dans lesquels deux molécules de sulfamide sont unies l'une à l'autre. Sa formule est la suivante :



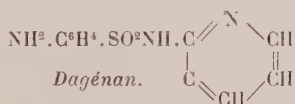
L'Uliron a été introduit dans la thérapeutique surtout pour le traitement de la blennorrhagie et des infections à staphylocoques. Il a donné lieu à des polynévrites assez graves qui peut-être s'opposeront à son emploi étendu (Hullstrung, Löhe, Cokkinis,

etc.), mais qui peuvent être dues à de simples coïncidences.

Du reste, on ne peut pas demander à des médicaments aussi actifs d'être tout à fait anodins. On a beaucoup exagéré les phénomènes toxiques qui sont certainement beaucoup moins nombreux et de conséquences beaucoup moins graves que ceux qui sont dus à l'abus des boissons alcooliques.

Tout récemment, les chimistes anglais Ewins et Philipps ont préparé un produit très intéressant qui est un dérivé immédiat de l'aminophénylsulfamide mais qui en diffère en ce sens que ce n'est pas un amide de l'ammoniaque mais d'une amine organique : l'aminopyridine : c'est donc l'aminophénylsulfamidopyridine ou *Dagénan*.

Tout comme l'aminophénylsulfamide, ce nouveau corps est un antibactérien polyvalent actif contre le streptocoque, le méningocoque, le colibacille ; mais, ce qui lui donne sa physionomie particulière, c'est la netteté de sa puissance thérapeutique dans les infections à pneumocoque et à gonocoque. Ce corps est encore connu sous le n° 693. Il a déjà fait l'objet de nombreuses publications. Il est bien toléré et, s'il est préférable de l'employer en association avec des soins locaux dans le traitement de la blennorrhagie — ainsi que le recommande Palazzoli — il peut être utilisé seul lorsque les soins locaux sont impossibles à mettre en œuvre. Ce médicament semble appelé à un très brillant avenir.

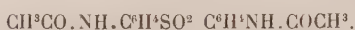


Plusieurs autres dérivés sulfurés ont été décrits, et en particulier les dinitro- diamino- et *p*-nitroaminosulfones. Tous ces corps sont plus ou moins actifs. Quelques dérivés de ce type (nitroaminodiphénylsulfoxyde) ont été préparés par André Girard et leur action sur le gonocoque a été rapportée par C. Levaditi, etc. Ils ne se sont pas maintenus dans la pratique médicale. Il n'en est pas de même des aminodiphénylsulfones.

Cette série de substances a été étudiée presque en même temps en Angleterre par Buttle, Stephenson, Smith, Dewing et Foster, et en France par Fourneau, M. et M^{me} Tréfouël, Nitti, Bovet (elle avait été préparée auparavant par Fromm et Wittmann, à Fribourg, en 1908). Le dérivé diaminé, ainsi du reste que le dérivé dinitré correspondant, est très certainement le plus actif de tous sur le streptocoque et sur le pneumocoque, mais à cause de sa toxicité on n'a pu le mettre dans le commerce, peut-être à tort car il suffirait peut-être de bien mesurer son administration.

Par contre, le dérivé diacétylé, ou *Rodilone*, étudié par les savants français cités plus haut, est très actif sur les strepto-

coques. Il agit également très bien sur les gonocoques, ainsi que l'ont montré, les premiers, Heitz-Boyer et Palazzoli.



Je ne peux m'étendre sur les applications cliniques de l'aminophénylsulfamide et de ses dérivés. Je me bornerai seulement à la plus sensationnelle de ses applications : la guérison des méningites à streptocoque, à méningocoque et à pneumocoque.

D'après des statistiques très sérieuses fournies par Cawthorne et par Gray, discutées et reprises par Devernoix dans sa remarquable thèse sur les méningites septiques, on a relaté 72 cas de guérisons spontanées de méningites streptococciques entre 1900 et 1936, soit donc une moyenne de deux par an, et cela dans le monde entier, du moins dans des pays où des statistiques sérieuses ont été faites. Or, depuis l'apparition de l'aminophénylsulfamide, on a relaté plus de 80 cas de méningites à streptocoque, identifiées dans le liquide céphalo-rachidien et guéries par l'aminophénylsulfamide presque exclusivement employé actuellement dans le traitement des méningites, si on en croit de nombreuses publications.

Voici du reste ce que dit Cawthorne dans sa communication du 5 février 1938 (*Lancet*, p. 305) :

« Il y a peu de maladies dans lesquelles l'issue fatale soit plus à craindre que dans les méningites à streptocoque. Depuis l'introduction du sulfamide, aucun autre agent chimique thérapeutique n'est plus employé dans cette maladie. Le médicament a complètement transformé l'évolution des méningites. »

Dans un article signé avec Delaunay, René Martin, qui a été le premier à employer le sulfamide dans le traitement des méningites à streptocoque en France, s'exprime ainsi dans les *Annales Médico-Chirurgicales* (mars 1938, p. 86) :

« De tous ces travaux que, faute de place nous ne pouvons détailler, il résulte très nettement que le sulfamide constitue un progrès considérable dans le traitement des méningites à streptocoque. »

Je signalerai, enfin, une opinion de Debré et ses collaborateurs : ces auteurs estiment que le pronostic de la méningite suppurée à streptocoque est totalement transformé depuis la découverte du sulfamide.

Je terminerai cet exposé par quelques citations extraites de conférences ou articles faits par des savants étrangers, en particulier par W. E. James, en Angleterre :

« Indubitablement l'introduction des sulfanilamides a été la contribution la plus importante apportée à la médecine au cours des vingt dernières années. »

T. E. Lescher, à la British Pharmaceutical Conference (Liverpool, 1937) écrit ce qui suit :

« Le progrès le plus important dans cette voie a été récemment l'introduction des dérivés de la sulfonamide dans le traitement des affections provoquées par le streptocoque hémolytique. »

En résumé, ce sont les laboratoires allemands qui ont fourni, les premiers, aux médecins, un produit vraiment efficace contre les infections bactériennes : le Prontosil.

Sans diminuer en rien l'immense intérêt de la découverte des savants allemands, celle des propriétés de l'aminophénylsulfamide (1936), un des constituants du Prontosil, faite par J. et M^{me} J. Tréfouël, Nitti et Bovet, est tout aussi sensationnelle, car il s'agit ici d'une substance très simple, incolore, cristallisée, très peu toxique et qui, tout aussi active que le Prontosil contre certaines infections à streptocoque, est en outre active sur les gonocoques et les méningocoques, dans tous les cas quand les centres nerveux sont atteints.

A l'heure présente, on compte, à côté du Prontosil, le Prontosil soluble, le Rubiazol C, l'aminophénylsulfamide (que nous appellerons, pour simplifier : Septoplix), l'Uliron, la Septazine, la Soluseptazine, le Dagénan, soit huit médicaments, dont deux paraissent polyvalents. Cette polyvalence est fort intéressante. Après vous avoir montré l'intérêt de la notion de spécificité, je me demande maintenant si l'avenir n'est pas aux médicaments non spécifiques.

Bien entendu, dans la série des infections bactériennes sur lesquelles la chimiothérapie agit, il y a des degrés. Le germe le plus fragile viv-à-vis des nouveaux remèdes semble être le streptocoque hémolytique et, sur lui du reste, agissent tous les dérivés sulfamidés connus, même le plus faible d'entre eux.

Mais, parmi ces médicaments, les deux plus actifs sur chacune de ces infections, sont justement ceux qui agissent sur toutes, l'aminophénylsulfamide (Septoplix), le Dagénan.

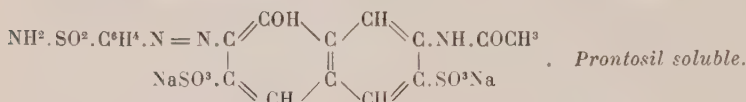
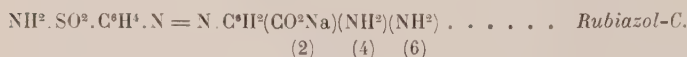
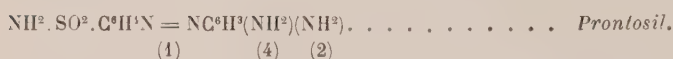
Il est intéressant de constater que trois corps très simples et de constitution très voisine ont servi de point de départ pour la chimiothérapie des maladies à trypanosomes et à spirilles, des leishmanioses et des maladies bactériennes :



Tous trois possèdent une fonction aminée dans la position para ou (4) par rapport au groupement fonctionnel caractéristique.

Nous donnons ici la formule des médicaments dont il a été

question dans cette conférence et qui ne figurent pas dans le texte :



Plus de 1.500 publications ayant été consacrées, dans ces deux dernières années, aux seuls médicaments antibactériens, il m'est impossible de donner ici une bibliographie complète de la question et je me bornerai à indiquer trois monographies publiées dans trois pays différents et qui mentionnent les publications les plus importantes :

F. MIETZSCH. *Ber. Abt. A.* **71**, n° 15, 1938.

R. OTTENBERG. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, **14**, n° 8, août 1938, p. 453. *Annales Médico-Chirurgicales*, **3**, n° 3, mars 1938.

M. Schopfer. — M. Fourneau a parlé de moisissures et de graines servant de test pour l'étude de l'action antiseptique (bactériostatique) de l'aminophénylsulfamide, de ses dérivés et de ses isomères. De quels organismes s'agit-il ?

M. Fourneau. — De l'*Aspergillus niger*, du *Mucor mucedo* et de *Penicillium glaucum*. Nous avons également fait des essais sur des graines de cresson alénois.

M. Schopfer. — A-t-on étudié les relations existant entre la composition générale du milieu de culture et la toxicité *in vitro* d'une substance ? Une variation de la source carbonée ou azotée n'influe-t-elle pas sur le pouvoir bactéricide ?

M. Fourneau. — Il est certain que la question de milieu joue un rôle considérable, mais elle est encore assez peu étudiée car elle se pose d'une manière différente pour chaque variété de microbe. L'influence de très faibles traces de métaux, par exemple, a été mise récemment en lumière par M. Gabriel Bertrand au dernier Conseil Solvay et on peut se reporter à sa communication et aux

discussions fort intéressantes qui l'ont accompagnée. Nous avons cependant effectué au Laboratoire des recherches non encore publiées sur l'influence que peuvent exercer divers sucres et composés azotés sur le développement des cultures de moisissures en présence ou non d'aminophénylsulfamide. Dans des milieux contenant, à la place du glucose, du saccharose et du lactose et, à la place de nitrate d'ammonium, du chlorure d'ammonium et du nitrate de potassium, les cultures, comme on le savait déjà, se développent normalement : elles sont au contraire arrêtées dans tous les cas étudiés en présence d'aminophénylsulfamide. Par conséquent, les variations apportées aux sources carbonées et aux sources d'azote n'influent pas sur le pouvoir bactériostatique de l'aminophénylsulfamide, du moins dans les limites très étroites des expériences effectuées.

(Voir Rapports et discussions sur les vitamines et les hormones, Sixième conseil de chimie, Institut International de Chimie Solvay, octobre 1937, rapport de G. Bertrand, p. 1. *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 652, note de M. Fourneau et ses collaborateurs.)

COMMUNICATIONS

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE QUELQUES DÉRIVÉS NOUVEAUX SUR LES STREPTOCOQUES ET LES PNEUMOCOQUES

par F. NITTI, D. BOVET, M. et M^{me} J. TRÉFOUËL.

La chimiothérapie antimicrobienne s'est notablement enrichie au cours de ces dernières années. Les dérivés actuellement connus peuvent être classés en deux groupes principaux.

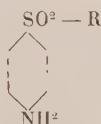
1° *p*-aminophénylsulfamide et ses dérivés.

Les dérivés de substitution sur la fonction amine libre sont, en général, beaucoup moins actifs que 1162 F et beaucoup moins polyvalents.

Par contre, les dérivés de substitution sur la fonction amide semblent beaucoup plus intéressants et, notamment, le dérivé pyridinique (*p*-aminobenzènesulfamidepyridine ou 693-MB) qui est très actif dans les infections streptococciques et pneumococciques expérimentales et dans la gonococcie chez l'homme.

2° Les dérivés du di- (*p*-aminophényl) sulfone (1358 F). Seuls ont été employés en clinique les dérivés acétylé (1399 F) et formylé (1423 F) avec des résultats très satisfaisants. Il est intéressant de

remarquer que dans ces deux séries sulfamide et sulfone existe une partie commune :



R étant NH^2 dans le sulfamide, $\text{C}^6\text{H}^4\text{NH}^2$ dans le cas des sulfones, et un reste alcoylé ou aliphatique dans les sulfones mixtes.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LE MÉCANISME D'ACTION DE LA DI- (*p*-AMINOPHÉNYL) SULFONE (1358F)

par D. BOVET, M. et M^{me} J. TREFOUEL, F. NITTI et M^{me} V. HAMON.

L'urine d'un animal traité par le 1358 F renferme une forte proportion du dérivé aminé libre, une plus petite quantité du dérivé à amine bloquée. Après acétylation totale (expérimentale) de l'urine, il est possible d'en isoler un produit cristallisé, identique à la di- (*p*-acétylaminophényl) sulfone (1399 F) [forme cristalline ; points de fusion ; libération du 1358 par desacétylation].

L'urine d'un animal traité par le dérivé di-nitré correspondant (1357 F) renferme, d'une manière analogue, les dérivés aminé et acétylé retrouvés dans le cas précédent.

Les dosages ont pu être effectués par voie chimique et par voie biologique.

Les concentrations correspondent à celles qui exercent, *in vitro*, une action bactériostatique.

RAPPORT ENTRE LA VITESSE DE RÉDUCTION DES MATIÈRES COLORANTES AZOÏQUES ET LEURS PROPRIÉTÉS THÉRAPEUTIQUES

par M. et M^{me} J. TREFOUEL, F. NITTI, D. BOVET et M^{me} V. HAMON.

La réductibilité des colorants azoïques varie avec leur constitution chimique et conditionne leur mode d'action dans l'organisme.

Certains azoïques agissent par l'ensemble de leur molécule

(exemple : Trypan bleu), d'autres (exemple : Prontosil) doivent leurs propriétés thérapeutiques à la libération de la partie active (*p*-aminophénylsulfamide).

La *rapidité* de réduction joue le rôle primordial : elle est un facteur limitatif dans le premier cas, essentiel dans le second.

TENTATIVES DE CHIMIOTHÉRAPIE ET DE CHIMIOPRÉVENTION DANS UNE TRYPANOSOMIASE ARSÉNORÉSISTANTE ET DANS LA SYPHILIS EXPÉRIMENTALE

par A. BESSEMANS, A. VAN MEIRHAEGHE, E. VAN THIELEN,
H. DE WILDE, P. WITTEBOLLE et O. DE BORCHGRAVE.

(*Institut d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de l'Etat
à Gand. Directeur : Prof. Dr A. BESSEMANS.*)

Nous avons tâché de guérir et prévenir l'infection provoquée chez le cobaye par une souche arséno-résistante de « Trypanosoma gambiense », d'abord au moyen de « trystibine » (dérivé antimonie trivalent), ensuite au moyen de « belganyl » (similaire à la « germanine » et au « moranyl »).

L'action prophylactique de la trystibine fut nulle, et la dose même maximale ne fit disparaître que passagèrement les parasites du sang périphérique. Le belganyl fournit les meilleurs résultats thérapeutiques à raison de cinq administrations, une tous les huit jours, chaque fois de 5 centigrammes par kilogramme ; la prévention fut réalisée, en général, soit par une ou deux administrations de 5 centigrammes contre une ou deux infections, dont la dernière provoquée jusque soixante-dix jours plus tard, soit par 25 centigrammes en une fois contre une seule infection, même retardée de quatre mois. La combinaison trystibine-belganyl ne se montra pas plus favorable.

Nos essais dans la syphilis expérimentale du lapin visèrent, d'une part, la chimiothérapie de la kératite d'inoculation par l'administration perorale de dichlorhydrate de gènoquinine ou de « C 77 » Giemsa ; d'autre part, l'antéphyllaxie de la même forme de kératite au moyen de diverses pommades antisypilitiques.

La quinine *per os*, même aux fortes doses que permit son emploi sous la forme des dérivés précités d'une toxicité amoindrie, ne produisit qu'un fléchissement éphémère des symptômes oculaires : elle ne peut servir que comme adjuvant dans les cures spécifiques.

Malgré l'action apparemment utile *in vitro* de leurs principes

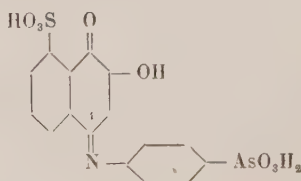
actifs, les pommades à base de quinine ne sont pas plus efficaces *in vivo* que leurs seuls excipients ; cette efficacité est d'ailleurs très faible et se limite à la première heure. Pendant les six premières heures, les pommades de Metchnikoff-Roux et de Gauducheau paraissent douées *in vivo* d'une certaine vertu antéphyllactique ; mais leurs seuls excipients la manifestent aussi pendant les deux premières heures. La méconnaissance facile de la syphilis inapparente et la difficulté de réaliser de bonnes conditions expérimentales, en particulier d'obtenir des témoins suffisamment variés et adéquats, doivent spécialement mettre en garde, dans un domaine où tant de facteurs disparates peuvent intervenir, contre les appréciations enthousiastes, fréquemment trop hâtives.

ESSAIS DE PRÉPARATION D'ARSENICAUX ORGANIQUES NON NEUROTOXIQUES ÉTUDE DE QUELQUES ACIDES ARSENICO-SULFONIQUES

par ERNST A. H. FRIEDHEIM (Genève).

Le facteur limitant l'application de tous les arsenicaux organiques pentavalents employés actuellement dans la lutte contre la maladie du sommeil est la toxicité pour le système nerveux central, en particulier pour le nerf optique.

Cette affinité néfaste pour le système nerveux serait due à la solubilité des arsenicaux dans les lipoides. Bien que cette application de la théorie de Meyer-Ovorton ne soit pas directement prouvée, elle suggère la préparation d'arsenicaux organiques insolubles dans les lipoides. Cet effet peut être obtenu en introduisant des groupes acides fortement dissociés, tel que le groupe sulfonique. Dans ce but nous avons employé le principe de la réaction de Ehrlich et Herter pour condenser des acides naphthoquinone-sulfoniques avec des acides amino-phényl-arsiniques. L'emploi de la fonction naphthoquinone s'imposait à la suite de l'observation que les oxynaphthoquinones ont, en soi, une certaine action trypanostatique. On obtient ainsi des acides du type [arsono-anilino]-naphthoquinone-sulfonique, dont la substance suivante (2654 N) se révéla comme l'exemple le plus important :



Nous avons essayé de nous rendre compte de l'importance qu'ont les différentes particularités de la structure de ce type de composé quant à l'effet thérapeutique et à la toxicité, en préparant et en examinant, dans la trypanosomiase expérimentale de la souris, une série d'isomères et de dérivés.

I. — ISOMÈRES DU 2654 N.

a) *Isomères de position du groupe sulfo :*

POSITION du groupe — SO ₂ H	DOSE MAXIMUM tolérée	DOSE MINIMUM curative	INDEX thérapeutique
Absent	0,02	0	0
6	0,6	0,6	1
7	0,2	0,2	1
8	0,6	0,2	3

Il en résulte que c'est le groupe sulfo en position 8 qui confère au produit un minimum de toxicité et un maximum d'effet trypanocide. C'est le sel sodique de ce produit, c'est-à-dire de l'acide 4-[4-arsono-anilino]1.2-naphtoquinone-8-sulfonique, portant dans nos notes le numéro 2654 N, qui a donné lieu à une étude expérimentale et clinique étendue, faisant ressortir l'innocuité parfaite de ce produit pour le système nerveux central et confirmant ainsi notre hypothèse de travail.

b) *L'isomère de position du reste anilino-arsonique*, portant ce reste en position 2, est très toxique (0,05 g/kg) et dépourvue de toute action trypanocide.

II. — MODIFICATIONS DU 2654 N LAISSANT LA STRUCTURE QUINONIQUE INTACTE OU PERMETTANT A L'ORGANISME DE LA RÉGÉNÉRER.

a) Le *leucodérivé* est réoxydé dans l'organisme. Il est légèrement plus toxique et à peu près aussi actif que le 2654 N.

b) *Un blocage du groupe hydroxyle en 2* par estérification avec du chlorure de benzoyle ou avec de l'éther éthylchlorocarbonique augmente légèrement la toxicité et diminue, mais sans l'effacer, le pouvoir trypanocide.

c) *L'introduction d'un groupe hydroxyle dans le noyau benzénique porteur du reste arsinique* (produit obtenu par condensation de l'acide 1.2-naphtoquinone-4.8-disulfonique avec l'acide 4-oxy-3-amidophénylarsinique) présente une forte diminution de la toxicité, allant de pair avec une forte diminution de l'action trypanocide (dose max. tol., 3,0 gr/kg ; dose min. cur., 0,7 gr/kg). Chose intéressante : le produit 2654 est éliminé essentiellement par le rein. L'introduction d'un hydroxyle en para par rapport

au reste arsinique dévie l'élimination sur le foie, et le produit phénolique, excrété avec la bile, quitte l'organisme par la voie intestinale.

III. — MODIFICATIONS DU 2654 N
SUPPRIMANT LA STRUCTURE QUINONIQUE.

a) L'estérification complète du 2654 N réduit avec le chlorure de benzoyle.

b) La formation d'azines par condensation du 2654 N avec l'*o*-phénylènediamine, l'acide *o*-diaminophénylarsinique et *o*-diaminophénylsulfonique, entraîne la suppression de tout pouvoir trypanocide.

QUATRIÈME SÉANCE

RAPPORT

LA MICROBIOLOGIE ŒCOLOGIQUE SES PRINCIPES — SON PROCÉDÉ

par S. WINOGRADSKY.

Le texte du rapport est publié dans la brochure adressée aux membres de l'Association et dans ces *Annales*, **61**, p. 731.

COMMUNICATIONS

CONTAMINATION ET SURINFECTION DANS LA LÈPRE

par E. MARCHOUX et V. CHORINE.

A défaut de moyens de cultiver et d'inoculer à une espèce sensible le bacille de Hansen, la lèpre du rat fournit un procédé, reposant sur la pathologie comparée, d'éclairer quelques-unes des obscurités dont s'entoure la lèpre humaine. Deux problèmes angoissants se posent à tous les léprologues : comment se prend la lèpre, la surinfection est-elle possible ?

Nous avons, à l'aide du rat, vu que le bacille peut pénétrer non seulement par une lésion cutanée, mais aussi sans aucune altération tissulaire, au travers de toutes les muqueuses saines. La porte d'entrée se révèle par l'infection des ganglions vers lesquels convergent les lymphatiques de la région où les bacilles ont été déposés. L'infection des muqueuses oculaires, nasales ou buccales, entraîne celle des ganglions sous-maxillaires. Des voies supérieures du pharynx, du larynx et de l'œsophage, elle va aux ganglions péribronchiques, de l'estomac aux ganglions mésentériques, du rectum et des muqueuses génitales aux ganglions du petit bassin.

Une deuxième inoculation, faite à un rat infecté, ne réveille pas de phénomène de Koch. Chaque introduction nouvelle de bacilles donne naissance à un nouveau foyer.

De ces recherches faites sur le rat, il est permis de penser que dans la lèpre humaine la contamination par les muqueuses saines est possible et que les malades sont sujets à des réinfections possibles.

**LES FERMENTS ANAPHYLACTIQUES, LEUR NATURE,
LEUR MODE D'ACTION,
LEUR ANALOGIE AVEC LES ANTICORPS MICROBIENS
FIXATEURS D'ALEXINE**

par F. MAIGNON.

(*Ecole Vétérinaire d'Alfort.*)

Dans des recherches antérieures (*C. R. de l'Acad. des Sc.*, **200**, 1935, p. 1154), nous avons montré l'existence d'une substance sensibilisante dans le sang de chiens anaphylactisés au sérum de cheval ou à l'ovalbumine et la présence simultanée, dans le sang de sujets en état de présensibilisation anaphylactique, de la même substance sensibilisante et d'une autre substance, sinon désensibilisante, tout au moins préservatrice. Ces substances sont obtenues par un procédé d'extraction des diastases. Nous avons séparé la substance préservatrice de la substance sensibilisante par fixation de cette dernière sur l'antigène coagulé. Le filtrat ne contient plus que la seconde.

Nous avons interprété ces faits en admettant que les protéines injectées dans le sang, lors de l'injection sensibilisante, subissent une dégradation en deux temps, comme dans les cavités digestives, sous l'action successive de deux ferments ou de deux catégories de ferments. Les premiers s'attaquent à la protéine intacte et aboutissent aux stades de dégradation constituant les poisons anaphylactiques (polypeptides ou dérivés décarboxylés), les seconds achevant la dégradation jusqu'aux stades atoxiques.

Nous avons montré que l'état de sensibilisation est dû à la persistance des premiers ferments producteurs de poisons, après disparition des seconds, destructeurs de poisons, dont la spécificité est beaucoup moins étroite et qui peuvent, de ce fait, être utilisés par l'organisme à la destruction des polypeptides d'usure.

Nous avons expliqué ainsi la nécessité d'une période latente de sensibilisation qui est le temps nécessaire à la disparition des seconds ferments.

Ces ferments anaphylactiques sont-ils des catalyseurs apparus de toute pièce, ou des activants de l'alexine, à la façon des anti-

corps microbiens désignés sous le nom de sensibilisatrices, le catalyseur étant représenté, dans ce cas, par l'alexine ?

Nous avons montré précédemment (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 93, 1925, p. 400 et 109, 1930, p. 93) que les catalyseurs (trypsine, amylases) ne se comportent pas, vis-à-vis de l'électrolyse prolongée, comme de simples protéines. Alors que, pour les catalyseurs, il faut quatre à cinq jours d'électrolyse pour obtenir la dissociation complète et *définitive* du groupement organo-minéral, ce résultat est obtenu au bout de trois à cinq heures avec les protéines inactives. D'autre part, pour les catalyseurs, il y a une coïncidence exacte entre l'obtention de ce résultat, qui se traduit par la cessation de l'entraînement des floculats vers l'électrode et la perte totale de l'activité diastasique.

Avec un de nos élèves, P. Trefeu, nous avons soumis à l'électrolyse prolongée les premiers ferments anaphylactiques. Nous avons constaté que l'état de non-entraînement des floculats est obtenu au bout de deux jours au lieu de quatre ou cinq et que cet état ne coïncide pas avec la perte d'activité. Si l'on arrête à ce moment l'électrolyse et que l'on mélange le liquide des deux tubes, le dépôt se redissout et le tout, injecté à des sujets neufs, transmet toujours l'anaphylaxie passive. La substance sensibilisante n'est donc pas un catalyseur. Est-ce un ferment activant de l'alexine, à la façon des sensibilisatrices ?

Les sensibilisatrices dévient le complément par fixation de l'alexine, dans la réaction de Bordet-Gengou. Nous avons recherché, avec un de nos élèves, A. Gaye, si les ferments anaphylactiques se comportaient de même et la réponse a été positive pour les premiers et les seconds ferments.

Les ferments anaphylactiques ne sont donc pas des catalyseurs, mais des activants de l'alexine, comparables à l'entérokinase de Pavlof vis-à-vis de la trypsine ou plus exactement de la protéinase tryptique.

Nous pensons que ces ferments activants sont simplement de grosses molécules possédant à la fois de l'affinité d'adsorption, par accrochages chimiques au moyen de valences libres, pour le catalyseur et les substances sur lesquelles celui-ci doit agir.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'ACTION MICROBICIDE DES OZONIDES

par E. RAMEL et C. VULLIÉMOZ.

(Clinique Dermatologique Universitaire, Lausanne.)

L'action microbicide de l'ozone, signalée en 1894 par Morton, vérifiée en 1903 par Arloing et Troude pour le bacille de la diphtérie n'est pas encore élucidée de façon définitive et nous avons tenté de vérifier dans une série d'expériences *in vitro* la modalité des effets exercés par l'ozone sur des variétés microbiennes définies.

Le mélange d'oxygène ozonisé dont nous avons fait usage dans ce but était caractérisé par une concentration d'ozone variant entre 1,4 et 1,8 p. 100 et nous l'obtenions d'un effluveur électrique à basse fréquence (50 alternances par seconde), travaillant sous une tension variant de 4.000 à 8.000 volts, avec un débit d'oxygène de 30 litres-heure.

Ce chiffre de 1,4 à 1,8 p. 100, n'est pas l'effet du hasard, mais traduit la concentration optimale de l'ozone, qui déploie dans ces conditions une action catalytique maximale sur les molécules d'oxygène du mélange. C'est ce qu'ont bien montré Briner et ses collaborateurs, en mesurant la quantité d'acide benzoïque formée par transformation de son aldéhyde sous l'influence de l'ozone.

L'oxygène ozoné, opérant par barbotage dans les milieux de culture liquides (bouillon peptoné de pH 7,3) préalablementensemencés par le *Bacterium coli*, le streptocoque hémolytique, le staphylocoque doré, voire la bactériodie charbonneuse, a manifesté dans tous les cas une action bactéricide, d'intensité variable selon les espèces microbiennes. Cette action destructrice était totale en deux minutes déjà pour le colibacille et la plupart des races de streptocoques, tandis que le staphylocoque doré résistait pendant dix minutes et qu'il ne fallut par moins de trente minutes pour obtenir la lyse complète des filaments contenant les bactériodies charbonneuses et leurs spores.

Dans tous les cas l'équilibre acido-basique du milieu s'est modifié sous l'effet de l'ozone dans le sens de l'acidité, le pH se déplaçant déjà de 7,3 à 5,6 après un barbotage de dix minutes. Cette modification est stable et s'accroît peu sous l'effet d'une

ozonation prolongée. On observe durant le traitement une décoloration du milieu qui n'est pas d'ailleurs définitive, mais ne se dissipe que lentement, en quelques jours.

L'action préalable de l'oxygène ozoné sur le milieu le rend impropre au développement des microbes et la durée de cette action empêchante est d'autant plus longue que fut plus prolongée l'action de l'ozone.

On pourrait être tenté d'expliquer simplement cette action empêchante par la destruction des substances nutritives du milieu sous l'influence des oxydations activées par l'ozone : tel n'est pas le cas. L'oxygène ozoné ne détruit pas les substances organiques du milieu, mais forme avec elles des combinaisons moléculaires complexes, les *ozonides* (Harries, Briner, Staudinger), qui sont très stables et caractérisées par la propriété qu'elles ont de conserver l'activité peroxydique possédée par la molécule d'ozone fixée.

L'ozonation du milieu ne signifie donc pas son épuisement, ainsi que nous l'avons vérifié par l'ozonation préalable durant dix-huit heures de tubes de bouillon peptoné, suivie de leur ensemencement par le colibacille ou le staphylocoque. Dans l'un et l'autre cas, les tubes traités se trouvaient stérilisés après quarante-cinq jours. Mais leur réensemencement, pratiqué le quarante-sixième jour, nous a montré que les milieux avaient récupéré dans une certaine mesure leurs propriétés : les tubes repiqués par le bacille pyocyanique, le colibacille et le staphylocoque montraient qu'après vingt-quatre heures le colibacille et le staphylocoque doré seuls s'étaient développés. Mais leur développement ne fut que temporaire, car après quarante-huit heures, le colibacille, et après soixante-douze heures le staphylocoque étaient détruits. Il est vraisemblable d'admettre que ce fléchissement momentané du pouvoir inhibiteur des milieux ozonisés résulte de la désagrégation par vieillissement d'une certaine quantité d'ozonides.

L'étude comparative des actions microbicides manifestées par l'ozone et l'oxygène montre sans aucun doute la supériorité du premier de ces corps : tandis qu'un bouillon peptoné, subissant l'ensemencement préalable du staphylocoque doré, puis traité vingt-quatre heures plus tard et durant huit heures par l'ozone, acquérait un pouvoir destructeur total pour ce microbe — son pH s'abaissant de 7,3 à 5,6 — le même milieu soumis à l'action de l'oxygène (débit : 30 litres-heure) durant treize heures et demie, subissant une modification du pH de 7,3 à 6,2, n'exerçait qu'une action inhibitrice relative sur le développement des staphylocoques, cette action se mesurant par la numération des staphylocoques, pratiquée dans la culture traitée par l'oxygène et dans la culture témoin :

Culture oxygénée	228.000.000 par centimètre cube.
Culture témoin	776.000.000 par centimètre cube.

En résumé, l'ozone, mélangé à l'oxygène aux concentrations (1,4 - 1,8 p. 100) qui favorisent au maximum son pouvoir catalytique d'oxydation, exerce sur les microbes en culture une action microbicide dont le mécanisme paraît dépendre surtout de la production d'ozonides.

INTERACTIONS MICROBIENNES ÉTUDIÉES PAR LA MÉTHODE DE LA PARABIOSE

par M. LISBONNE, L. NÈGRE, R. SEIGNEURIN et G. ROMAN.

Nous étudions depuis plusieurs années les modifications biologiques qu'on peut imprimer aux espèces microbiennes en les faisant vivre en « parabiose ».

La culture en parabiose est réalisée par l'emploi de tubes d'Asheshof modifiés par nous. Deux espèces microbiennes différentes, mais voisines ou encore deux races d'une même espèce peuvent ainsi se développer, séparées l'une de l'autre par un septum de collodion, mais dans des conditions telles que leurs produits de métabolisme peuvent mutuellement s'influencer.

I. *Parabiose* : 1° De *B. coli*, *B. aerogenes* ; 2° de *B. coli*, Para A et *B. Eberth*. — Il n'y a pas d'antagonisme entre ces espèces qui se développent également pendant toute la durée de l'expérience (six à huit mois).

Un certain nombre de *B. aerogenes* acquièrent au voisinage de *B. coli* l'aptitude de faire de l'indol, mais perdent en revanche celle de produire de l'acétyl-méthyl-carbinol. Ils tendent vers le type *B. coli*.

B. coli, en présence de *B. Eberth* produit de l' H_2S . Il en est de même pour para A qui, dès le deuxième passage au voisinage de *B. Eberth* fait autant d' H_2S que ce dernier.

II. *Parabiose* de *Br. melitensis* et de *Br. abortus*. — *Br. abortus* (n° 45 de notre collection) mis en présence de *Br. melitensis* (n° 105) perd sa vitalité dès le deuxième passage.

Par contre, ce même *melitensis* meurt rapidement en présence de *Br. abortus* n° 512.

Ce phénomène, dont il n'est pas possible à l'avance de prévoir l'éventualité, montre qu'il existe une véritable « incompatibilité » entre deux races, deux types d'une même espèce.

Nous indiquerons ultérieurement les modifications du comportement des souches vis-à-vis des colorants d'Huddleson.

III. *Parabiose* de *B. tuberculeux divers* et BCG. — Le phénomène le plus remarquable est que BCG est rapidement inhibé dans son développement en parabiose avec un bacille bovin. Dès

le quatrième passage, il est mort. Rien de tel au contact du B. aviaire ou même d'un B. lisse (Becret).

Nous étudions les modifications de virulence de races ainsi opposées deux par deux.

M. **Wollman** rappelle, à propos de la communication de M. Lisbonne, qu'il y a quelques années M. Burnet a pu transmettre la thermoagglutinabilité d'une race thermoagglutinable à une race non thermoagglutinable de *Br. melitensis*, et que Wollman a pu rendre agglutinable par un sérum anti-para B un *B. coli* cultivé en présence du bacille paratyphique B. Le résultat a été négatif avec le bacille paratyphique A, espèce plus éloignée. Il semble bien que les faits très intéressants rapportés par M. Lisbonne puissent être classés parmi les phénomènes de « para-hérédité ».

VACCINATION DU COBAYE CONTRE *BRUCELLA MELITENSIS*

par M. LISBONNE

en collaboration avec G. ROMAN et G. RENOUX.

Jusqu'à aujourd'hui, aucun expérimentateur, à notre connaissance, n'est parvenu à immuniser le cobaye contre *Br. melitensis* (1), pas plus du reste que les autres espèces animales telles que chèvre, brebis ou vache.

Les vaccins « tués » ne vaccinent pas. Les microbes vivants qu'on a utilisés à cette fin sont, ou avirulents pour le cobaye et se comportent comme des vaccins tués ou doués de quelque virulence : dans ce cas, ils infectent définitivement l'organisme et l'on ne peut plus parler de vaccinations ultérieures.

Nous sommes parvenus à réaliser l'immunité « vraie » du cobaye au moyen d'un vaccin qui associe une souche absolument avirulente de *Br. abortus bovis* (B. 112) et les substances glucido-lipidiques extraits de *Br. melitensis* par la technique de Boivin.

La coopération des deux substances nous a paru indispensable. La souche microbienne est dénuée de toute action vaccinnante ; l'antigène G. L. se comporte comme un antigène complet, susceptible de susciter la formation d'anticorps et d'allergiser l'animal. Il augmente nettement la résistance à l'infection, mais d'une façon inconstante et insuffisante.

(1) Dans ces temps derniers, MAC EWEN serait arrivé à vacciner le cobaye contre *Br. Abortus*, au moyen de souches avirulentes. Les résultats nous ont semblé plus inconstants que les nôtres.

Par contre, l'injection simultanée intradermique à trois reprises de 0 c. c. 5 d'antigène Boivin et de plusieurs milliards de *B. 112* vaccinent l'animal au point qu'il résiste à l'inoculation ultérieure d'un million de *Br. melitensis*, extrêmement virulents (près de 100 fois la dose infectante).

Les animaux vaccinés suivis pendant plusieurs mois ont des hémocultures toujours négatives : les taux d'agglutination élevés au début de l'expérience baissent rapidement (de 1/650 à 1/10 et moins), les réactions allergiques diminuent d'intensité et se négativent même. A l'autopsie, absence de toutes lésions, si minimes soient-elles. Les cultures des organes (foie, rate, ganglions) sont toutes stériles.

Dans deux séries de recherches ayant porté sur 20 cobayes, la vaccination a été obtenue dans 80-85 p. 100 des cas. Nous ignorons la durée de l'immunité et sa solidité vis-à-vis de doses infectantes plus importantes.

La méthode paraît applicable aux espèces animales bovine et caprine. Des essais sont actuellement en cours dans le but de les protéger contre l'avortement brucellique.

L'IMMUNITÉ D'ADAPTATION ET L'IMMUNITÉ DE DÉFENSE

par S. METALNIKOV.

De nombreux biologistes et bactériologistes interprètent l'immunité comme une adaptation progressive de l'organisme à des doses croissantes de virus ou de toxine.

Ce genre d'immunité existe en effet : les cellules vivantes, de même que n'importe quel organisme, peuvent s'adapter à toutes les substances toxiques. Cette adaptation est toujours accompagnée d'une diminution de la sensibilité des cellules envers ces substances.

Mais l'immunité d'adaptation, qui se produit lentement, ne peut pas défendre l'organisme contre l'invasion des microbes, car ceux-ci se multiplient avec une grande rapidité. Il faut donc admettre qu'il existe d'autres moyens de défense pour protéger l'organisme contre l'invasion des microbes ou autres parasites.

C'est ce qu'on appelle l'immunité de défense.

L'organisme peut résister aux microbes en produisant tout une série de réactions de défense, lesquelles sont à la base de l'immunité naturelle et acquise. Les réactions de défense peuvent se produire soit à l'extérieur (l'œil réagit par le clignotement et

par la sécrétion des larmes, le nez réagit par l'éternuement et par la sécrétion des glaires, etc.), soit à l'intérieur, quand un microbe passe dans le sang ou dans les cavités du corps et des organes.

Dans ce dernier cas, le parasite provoque une série de réactions défensives internes, qui ont pour but de le rendre inoffensif ou de le chasser de l'organisme.

La défense organique se réalise grâce à l'activité des différentes cellules et se réduit à cinq méthodes principales qui sont :

- 1° la digestion intracellulaire ou phagocytose ;
- 2° la formation de plasmode ou de cellules géantes ;
- 3° la formation de capsules qui mettent les cellules et les organes sains à l'abri des microbes ;
- 4° l'élimination des microbes par la formation d'abcès ;
- 5° la formation d'anticorps dont le rôle est important dans l'immunité acquise.

Il est impossible d'admettre que des processus si complexes et si conformes au but puissent se produire indépendamment du système nerveux.

Nous avons fait à ce sujet de nombreuses expériences sur les chenilles de la mite des abeilles (*Galleria melonella*). Ces insectes conviennent bien à ce genre de recherches, ils s'immunisent très facilement contre les divers microbes et présentent cet avantage que leurs centres nerveux sont très faciles à détruire par brûlure. C'est ainsi que nous avons démontré que la destruction du 3^e ganglion thoracique diminue rapidement chez eux l'immunité naturelle et acquise.

Dans une autre série de travaux nous avons démontré que chez les chenilles ligaturées l'immunité acquise de la partie antérieure du corps est transmise à la partie postérieure par le système nerveux.

Il est plus difficile de démontrer le rôle du système nerveux dans l'immunité chez les animaux supérieurs.

Nous basant sur un très grand nombre de travaux, nous pouvons affirmer que toutes les réactions cellulaires deviennent après l'immunisation, plus rapides et plus sensibles. C'est cette sensibilité renforcée (hypersensibilité) qui semble être la cause principale de l'immunité et de l'anaphylaxie. On peut dire que pendant l'immunisation toutes les cellules se mobilisent et se sensibilisent contre les microbes donnés comme s'il s'agissait pour elles de combattre un véritable ennemi.

Nous avons démontré qu'à la base de l'immunité se trouvent les réactions de défense. Attendu que ces réactions sont obligatoires et involontaires, nous pouvons dire que nous avons ici affaire à des réflexes de défense.

Si l'immunité est le résultat des réactions de défense ou de

réflexes, n'est-il pas possible, en se servant de la méthode de Pavloff d'obtenir des réflexes conditionnels ? Les expériences que nous avons faites avec nos collaborateurs nous ont donné des résultats positifs qui ont confirmé cette hypothèse.

UTILISATION DES MICROBES SPOROGÈNES POUR LA LUTTE CONTRE LES INSECTES NUISIBLES

par S. METALNIKOV.

Nous avons commencé nos études sur les maladies des insectes et leur immunité depuis une vingtaine d'années. Nous avons démontré que les insectes résistent très bien aux microbes les plus pathogènes pour l'homme et les animaux supérieurs (tuberculose, lèpre, diphtérie, etc.). Tous ces faits prouvent que les insectes sont admirablement armés contre les maladies infectueuses. Et cependant ils souffrent d'épizooties. Nous avons eu plusieurs fois l'occasion d'étudier des épizooties chez *Galleria mellona* et d'autres insectes nuisibles, et d'isoler des microbes sporogènes, très pathogènes pour beaucoup d'insectes, surtout pour les chenilles nuisibles.

Nous utilisons des spores sèches en poudre qui se conservent pendant plusieurs années.

En ajoutant à l'eau 2-4 grammes des spores, nous pulvérisons les émulsions sur les plantes, contaminées par des parasites. Les insectes mangent les feuilles avec les spores, s'infectent et meurent en un, deux ou trois jours. C'est ainsi que nous avons pu démontrer l'efficacité de notre méthode.

Dans une série de travaux, nous avons étudié et décrit les différents microbes sporogènes que nous avons isolés des insectes malades et morts.

Actuellement nous donnons la description des dernières expériences que nous avons faites sur les arbres fruitiers, sur les vignes et les plantes potagères.

En ce qui concerne les plantes potagères, nous avons eu l'occasion, dans le courant des années 1935-1937, d'étudier plusieurs invasions de chenilles dont, parmi des centaines, un grand nombre étaient mortes ou malades ; or, en étudiant les cadavres, nous avons pu découvrir plusieurs bactéries sporogènes ayant provoqué ces maladies.

Après avoir appliqué des émulsions de spores sèches par pulvérisation sur des centaines de choux, nous avons pu nous rendre compte de l'efficacité de ce traitement appliqué en plein champ. Tandis que sur les plans traités toutes les chenilles étaient mortes

après vingt-quatre à quarante-huit heures, sur les choux témoins, les chenilles, bien portantes, continuaient à ronger les feuilles.

De même, des expériences effectuées sur les arbres fruitiers de la maison Rousset-Bouscarde, de Cavaillon, près d'Avignon, sur des pommiers complètement ravagés par les chenilles tordeuses, ont été des plus concluantes et, d'après le rapport de M. Rousset lui-même, vingt-quatre heures après la pulvérisation des spores sèches en émulsion sur les arbres, toutes les chenilles étaient mortes.

Au cours de l'année 1937, nous avons étendu nos expériences et les avons exécutées sur une grande échelle, surtout dans des vignobles attaqués par une quantité énorme de parasites (pyrales des vignes: *cochyliis* et *eudemis*). Les essais ont été groupés dans cinq régions viticoles, les plus importantes de France :

1° Epernay (domaine Moët et Chandon) ;

2° Tours (Saint-Michel-sur-Loire, propriété du sénateur Germain) ;

3° Bordeaux (Pauillac, dans la propriété du Château-Mouton-Rothschild) ;

4° Narbonne (Sainte-Vallière, propriété de M. Cabanes).

Nous pouvons dire sans aucune exagération que tous les résultats enregistrés cette année ont dépassé de beaucoup nos prévisions les plus optimistes, et les pesées des récoltes ont fait ressortir une plus-value des raisins tout à fait exceptionnelle en qualité.

Ainsi par exemple, à Bouzy (maison Moët et Chandon), le traitement contre la chenille de la pyrale, avec une dose normale de spores de 1 gramme par litre, a fait baisser l'infestation des chenilles dans la proportion de 1 à 10 p. 100.

Des résultats identiques et même encore plus intéressants ont été observés à Bordeaux et à Tours avec le traitement contre la *cochyliis* et l'*eudemis*. Au comptage des grappes abimées par la chenille d'eudémis dans les essais fait à Pauillac, on a constaté sur 100 grappes examinées dans le lot contrôle : 5.224 grains piqués et sur 100 grappes traitées, seulement 416 grains piqués, c'est-à-dire 92 p. 100 de diminution de grains piqués due au traitement.

De même, à Sainte-Vallière, près de Narbonne, où la quantité de chenilles a été énorme, on a enregistré 16.350 grains piqués dans le contrôle et 1.884 dans le champ traité, c'est-à-dire 89 p. 100 de réduction de dommage occasionné par l'eudémis.

Après le traitement il y a eu aussitôt arrêt brusque du mal et cicatrisation des grains piqués. De plus, le carré traité a donné 5 hectolitres de vin alors que l'on aurait retiré à peine 50 litres de vin du carré de contrôle équivalent.

**PRODUCTION DE SUBSTANCES HISTAMINIQUES
PAR LES BACILLES MUQUEUX
EN MILIEU SYNTHÉTIQUE CONTENANT DE L'URÉE
COMME SEUL ALIMENT AZOTÉ**

par LÉVY-BRUHL et M^{me} G. UNGAR.

L'histaminogénèse microbienne est connue depuis les travaux de A. Berthelot et D. Bertrand (1912), Mellanby et Twort (1912), mais la production d'histamine signalée par ces auteurs et par ceux qui ont approfondi cette question, s'effectuait à partir de l'histidine, par décarboxylation.

Nous avons pu mettre en évidence, avec la collaboration de G. Ungar, la formation par les bacilles muqueux (groupe du pneumobacille) en milieu synthétique contenant de l'urée comme source unique d'azote et du glucose comme aliment carboné complémentaire, de substances histaminiques en quantité appréciable (3 γ par centimètre cube). Ces substances étaient caractérisées par leur action physiologique sur l'intestin isolé du cobaye, suspendu dans du liquide de Tyrode non glucosé, aéré et maintenu à 38°. La spécificité de la réaction se trouvait démontrée par l'action inhibitrice du 933 F. et par l'épreuve de Dale, ainsi que par sa persistance après addition d'atropine. Certains échantillons ont été également éprouvés sur la pression artérielle du Chat et cette épreuve a confirmé la nature histaminique de la substance en cause.

Le milieu synthétique utilisé avait la composition suivante :

Urée 3 grammes, glucose 5 grammes, chlorure de sodium 5 grammes, phosphate bi-potassique 1 gramme, sulfate de magnésie 0 gr. 20, eau distillée quantité suffisante pour 1.000 centimètres cubes. Ce milieu dont le pH était de 7-7,5 était réparti par fractions de 50 centimètres cubes en fioles d'Erlenmeyer, stérilisé vingt minutes à 120° etensemencé à partir de cultures en gélose.

Sur 35 échantillons de bacilles muqueux ainsi éprouvés, 6 n'ont pas poussé sur le milieu en question ou n'ont fourni qu'une récolte extrêmement maigre ; 13 souches ont donné une culture abondante mais sans production appréciable de substance active : 17 de ces bacilles en ont fourni des quantités qui, par comparaison avec une solution titrée d'histamine pouvaient être évaluées à 1 γ , à 3-4 γ par centimètre cube.

En étudiant spécialement trois des échantillons les plus hista-

minogènes, nous avons pu établir la courbe de production des corps actifs. Ceux-ci apparaissent vers le quatrième jour d'incubation et le taux s'accroît progressivement jusqu'au huitième ou dixième jour, puis il y a décroissance assez lente, en même temps que se produit une alcalinisation très nette du milieu.

D'autre part, nous avons substitué au glucose, dans la composition du milieu, d'autres éléments carbonés. La glycérine nous a fourni des résultats tout à fait comparables à ceux des milieux glucosés. Le citrate de soude, par contre, n'a pu être utilisé en raison de son action sur l'intestin du cobaye qui le rend impropre à toute expérimentation de cette nature. Nous avons également substitué à l'urée divers corps azotés (sels amonniacaux, asparagine). Dans de tels milieux la récolte microbienne est abondante, mais aucune production de substance histaminique ne peut être décelée.

Enfin des essais analogues poursuivis avec diverses souches de colibacille et de paratyphique B. ne nous ont fourni jusqu'à présent que des résultats négatifs.

RÉSISTANCE DE L'EMBRYON DE POULET AU L'INFECTION DUE AU *PLASMODIUM GALLINACEUM*

par V. CHORINE.

On sait, d'après les travaux de E. Brumpt, que les poules jeunes ou adultes sont très sensibles à l'infection due au *Pl. gallinaceum*. La maladie est très meurtrière, 80-90 p. 100 des animaux infectés succombent. La dose minima de virus capable de reproduire la maladie est très faible.

En infectant les œufs en incubation depuis sept à seize jours, suivant la méthode mise au point par Burnet, on constate que les embryons restent indemnes de toute infection. Pourtant, la membrane chorio-allantoïdienne porte toujours de petites lésions provoquées par l'opération par où pourrait pénétrer le virus. Si au lieu de déposer le sang infecté sur la membrane on l'injecte dans un vaisseau périphérique, les résultats sont les mêmes. Enfin, l'inoculation du sang palustre directement dans le corps de l'embryon ne se révèle pas plus efficace. Il convient d'ajouter que ces deux derniers modes d'infection s'accompagnent d'une grande mortalité due au traumatisme opératoire. Ces résultats se vérifient pour différentes températures d'incubation après l'infection.

Les parasites introduits dans l'embryon périssent rapidement, car l'embryon infecté depuis quarante-huit heures, broyé dans

l'eau physiologique, n'infecte pas la poule. Cependant, l'embryon ne possède pas lui-même un pouvoir toxique pour le *Pl. gallinaceum*, le broyage d'embryon mélangé avec le sang palustre défibriné est capable d'infecter un animal adulte même après vingt-quatre heures de contact.

Un fait important est que le poussin devient très sensible à l'infection dès qu'il commence à respirer. Il est évident qu'à ce moment il se produit un grand changement dans le métabolisme de l'organisme qui, jusqu'alors, s'est produit en vie en grande partie anaérobie.

On constate pour le *Pl. gallinaceum* un fait contraire à celui qu'on observe avec les nombreux virus filtrables pour lesquels le métabolisme de l'embryon convient mieux que celui du poussin ou de l'animal adulte. Les modifications brusques du métabolisme s'accompagnent de modifications profondes dont nous voyons apparaître le retentissement sur l'immunité naturelle, et nous pouvons dire que l'immunité naturelle et le métabolisme de l'organisme s'unissent par des liens très étroits.

M. Gavrilov. — A l'Institut d'Hygiène d'Anvers, nous avons également procédé à des essais de culture de *Plasmodium gallinaceum*, employant pour cela la méthode d'injection du sang de poule infectée avec le *Plasmodium* (sang hépariné ou sang défibriné) dans les vaisseaux de la membrane chorio-allantoïde du poulet ; les injections étaient faites en employant une micropipette et pratiquées sur des embryons âgés de dix à douze jours.

Les embryons ont été examinés deux, quatre, six, huit et dix jours après l'infection ; on a procédé à des frottis de sang et des organes de tous les embryons qui avaient succombé. Tous ces frottis ont été négatifs. 4 ou 5 œufs arrivés à terme ont donné naissance à des poulets sur lesquels des recherches analogues ont été pratiquées : ces recherches ont été négatives. Le broyat des organes et le sang de ces poulets, injectés par voie intraveineuse à des poules adultes, n'a déterminé d'infection chez aucune d'elles ; même les frottis de moelle osseuse des animaux inoculés ont montré l'absence complète de parasites.

Nous pouvons en conclure que l'embryon de poulet réagit à l'infection à *Plasmodium gallinaceum* d'une façon différente de la poule adulte.

DISSOCIATION PAR ÉLECTROPHORÈSE DU BACILLE PARATYPHIQUE B

par R. SEIGNEURIN.

On sait que les bacilles paratypiques B se présentent, en culture, comme constitués de deux sortes de germes : les uns chargés d'électricité négative, les autres chargés d'électricité positive. Nous nous sommes attaché à les dissocier et nous sommes arrivé à obtenir des cultures pures de chacun d'eux.

Cette dissociation s'obtient en soumettant à l'action d'un champ électrique une émulsion en eau distillée stérile de cultures de para B. L'ensemencement des liquides anodique et cathodique se fait, non pas sur milieux ordinaires, car on obtiendrait de nouveau le mélange initial, mais sur des milieux liquides spéciaux de pH relativement acide et d'ailleurs approprié aux deux sortes de germes. Par dissociations électrophorétiques et ensemencements successifs, on finit par obtenir des cultures pures de para B électro-positifs et de para B électro-négatifs.

Par vieillissement, il apparaît dans les cultures de bacilles positifs des éléments négatifs. La propriété électro-positive semble donc être l'apanage des germes jeunes : le vieillissement entraîne une négativation des charges.

Nous nous sommes demandé si la morphologie des colonies sur milieu de culture solide permettait une distinction entre les germes positifs et les négatifs. A première vue, il ne semble pas ; nos recherches sont d'ailleurs en cours.

La détermination du pouvoir pathogène et antigénique des souches positives et des souches négatives exige des expériences de très longue haleine ; néanmoins, dès maintenant, il nous paraît que les souches de para B électro-positives sont beaucoup plus virulentes que le para B ordinaire (pour le lapin et le cobaye). Néanmoins, elles paraissent peu antigéniques du fait que le sérum agglutinant obtenu par leur injection au lapin ne dépasse pas le titre de 1/400.

Des essais de réinfection croisée montrent que les souches positives confèrent une immunité s'exerçant aussi pour les souches normales de para B : la réciproque n'est pas vraie.

Signalons, pour terminer, que nous sommes arrivé à isoler également des souches positives et des souches négatives du bacille d'Eberth, et que nous étudions actuellement leurs propriétés biologiques. En opérant dans des conditions spéciales, il semble que le phénomène de dissociation électrophorétique s'étende à de nombreux autres germes.

M^{lle} **Choucroun**. — M. Seigneurin signale l'isolement, à partir du bacille paratyphique B typique, de deux souches : l'une électro-positive, l'autre électronégative, recueillies respectivement au pôle négatif et au pôle positif d'un appareil à électrophorèse.

Il semble qu'il y ait une erreur d'interprétation des résultats. Nous savons en effet que, par reflux hydrostatique (conséquence de l'osmose électrique), le liquide enfermé dans un tube parcouru par un courant peut ramener des particules chargées vers l'électrode qui les chasse, avec une vitesse d'autant plus grande que leur charge est plus petite.

Les bacilles dits positifs recueillis au pôle négatif par M. Seigneurin seraient seulement des bacilles négatifs moins faiblement chargés que ceux recueillis au pôle positif.

Les résultats biologiques intéressants trouvés par M. Seigneurin montreraient que des souches d'électrisation différentes ont des propriétés chimiques et biologiques différentes, ce qui est conforme aux suggestions que mes recherches sur le bacille tuberculeux et le bacille pyocyanique m'ont amenée à faire (*C. R. Acad. des Sciences*, **202**, p. 1711 et 1822).

M. **Boivin** fait remarquer que les divergences entre les résultats obtenus par M. Seigneurin et par M^{lle} Choucroun, dans l'électrophorèse du bacille paratyphique B, peuvent tenir au fait que les auteurs n'ont pas travaillé avec la même souche. Les souches de collection de para B sont susceptibles de renfermer, dans des proportions très variables d'un cas à l'autre, au moins six variantes bactériennes :

- Smooth cilié, en phase spécifique ;
- Smooth cilié, en phase non spécifique ;
- Smooth immobile ;
- Rough cilié, en phase spécifique ;
- Rough cilié, en phase non spécifique ;
- Rough immobile.

et l'on peut s'attendre à ce que ces variantes n'aient pas toutes exactement les mêmes propriétés électrophorétiques.

M. **Lisbonne** demande à M^{lle} Choucroun si elle a rencontré cette différenciation des charges électriques chez d'autres microbes. Les travaux de nombreux auteurs attachent tous au seul para B et à certains B. Shiga cette propriété de se diriger vers l'un et l'autre pôle. Si le phénomène se produit comme le pense M^{lle} Choucroun, on devrait observer ce curieux transport avec toutes les espèces microbiennes.

LA TUBERCULOSE CHEZ LES INSECTES

par V. ZERNOFF.

Les insectes présentent un objet particulièrement intéressant pour l'étude de l'infection expérimentale de la tuberculose et de l'immunité antituberculeuse. La chenille de la mite des abeilles, *Galleria mellonella*, nous donne un exemple des plus démonstratifs de l'immunité antituberculeuse.

D'après les travaux de S. Metalnikov et de ses élèves, la chenille de *Galleria mellonella* peut supporter des injections de doses massives de bacilles tuberculeux ; déjà quelques minutes après l'injection on observe chez elle une phagocytose très intense et les bacilles sont digérés et transformés en un pigment brun qu'on peut retrouver dans le sang des chenilles et même chez les papillons.

On pouvait supposer que cette immunité antituberculeuse était due à un ferment lipolytique dont l'activité tiendrait à la nourriture de ces chenilles, composée de cire d'abeille. Cependant, Metalnikov, Fiessenger, Hollande et autres ont pu constater une immunité antituberculeuse chez d'autres espèces de chenilles dont la nourriture est exclusivement végétale. De même, les courtilières ont une immunité naturelle très prononcée envers la tuberculose et l'on peut observer la phagocytose et la bactériolyse des bacilles tuberculeux dans leur sang.

Nous avons étudié l'infection tuberculeuse chez différents insectes et notamment chez les Phasmes (*Carausius morosus*) qui possèdent également une immunité naturelle antituberculeuse.

Dans une série d'expériences nous avons constaté que les Phasmes supportent très bien des injections massives de bacilles tuberculeux. Nous avons pu injecter aux jeunes *Carausius* jusqu'à 7 milligrammes de bacilles tuberculeux, ce qui représente plus du centième du poids de l'insecte. Les *Carausius* injectés ne manifestent aucun signe de maladie et continuent à se développer normalement.

L'étude du sang des *Carausius*, faite aussitôt après l'inoculation, montre des réactions cellulaires très intenses. Déjà trente minutes après l'inoculation on peut voir commencer la phagocytose ; une heure après on observe le début de la formation des cellules géantes décrites par Metalnikov chez les *Galleria* ; en même temps les phagocytes sont bourrés de bacilles, mais nous n'avons pu voir la digestion de ces bacilles ni leur transformation en un pigment brunâtre. Il faut noter que presque aussitôt après l'inoculation les bacilles sont tous accolés en masses plus ou

moins nombreuses entourées par les leucocytes ; on n'observe que très peu de bacilles libres.

Les bacilles phagocytés conservent pendant des mois leur acido-résistance à l'intérieur même des leucocytes. Nous avons pu retrouver dans le sang des *Carausius*, neuf mois après l'inoculation, des bacilles ayant conservé leur aspect normal.

Les *Carausius* supportent également des injections de doses massives de tuberculine, mais les insectes inoculés antérieurement avec des bacilles tuberculeux sont beaucoup plus sensibles envers la tuberculine.

Ces faits montrent que l'immunité envers la tuberculose est bien différente chez *Carausius* et chez la mite des abeilles. Tandis que chez celle-ci on observe la destruction complète des bacilles, chez *Carausius* cette immunité prend plutôt une forme de symbiose.

Nous avons observé chez les blattes une immunité antituberculeuse analogue à celle constatée chez les *Carausius*. On peut supposer que l'étude comparative et détaillée de l'immunité antituberculeuse chez les insectes fera ressortir nettement le rôle important que joue le ferment lipolytique chez les chenilles de *Galleria*.

M. Darzins. — L'absence de maladie ne signifie pas la présence de l'immunité. Différentes causes (température, constitution chimique du tissu de l'organisme, etc.) peuvent intervenir pour protéger l'organisme contre le bacille pathogène. Pour parler de l'immunité contre une maladie, il faut montrer que l'organisme peut acquérir la maladie dans des conditions déterminées. La simple disparition des bacilles de l'organisme infecté ne signifie pas encore l'état d'immunité.

MISE EN ÉVIDENCE PAR DES RÉACTIONS BIOLOGIQUES DE L'ÉTAT ALLERGIQUE D'ANIMAUX SENSIBILISÉS AVEC DIVERS COMPOSÉS CHIMIQUES

par N. KOSSOVITCH et M^{lle} Y. ARMAND.

Poursuivant l'étude de l'influence de la composition chimique des antigènes et des haptènes sur la spécificité des réactions sérologiques (précipitation, floculation, inhibition, fixation de complément, etc.), les auteurs ont recherché, en provoquant des phénomènes allergiques, le pouvoir sensibiligène de divers haptènes (corps chimiquement définis : azocomposés, dérivés arsenicaux, acides aminés, etc.).

M. Macheboeuf. — Le fait avancé par les auteurs d'une sensibilisation anaphylactique par simple injection de tyrosine ou de cystine à l'état de solution aqueuse paraît assez surprenant, car on admet, à l'heure actuelle, que la digestion intestinale des protéides déverse journellement dans la veine porte des quantités importantes de ces aminoacides. Faudrait-il donc admettre que l'injection parentérale intradermique de ces aminoacides provoquerait une sensibilisation que ne provoquerait pas le passage de ces substances dans le sang de la veine porte par absorption digestive ? Faut-il admettre, d'autre part, que l'organisme puisse se sensibiliser vis-à-vis d'un antigène que cet organisme possède normalement en son sein si cet antigène est simplement introduit par une voie inhabituelle : le derme ?

M. Renaux. — J'ai été quelque peu étonné d'entendre M^{lle} Armand dire qu'elle avait utilisé le phénomène de Schwartzman comme indicateur d'un état allergique de caractère spécifique.

UN CAS CONCRET DE RÉGRESSION DES MODIFICATIONS ADAPTATIVES CHEZ DEUX BACTÉRIES CELLULOLYTIQUES

par J. POCHON.

Deux espèces de bactéries cellulolytiques ont été décrites dans le tube digestif des mammifères : *B. cellulosa dissolvens*, en 1923, par Y. Khouvine, dans les fèces humaines, et *Pl. cellulolyticum*, en 1933, par nous-même, dans la panse des ruminants. Nous avons par la suite retrouvé dans la nature (fèces d'homme et de cobaye) un certain nombre de souches présentant des caractères intermédiaires entre ces deux espèces, au point de vue de la nécessité d'un facteur de croissance, de la chromogénèse, de l'anaérobiose, de l'haploméso-trophie et du pouvoir glucidolytique. Nous avons émis l'hypothèse que toutes ces souches dériveraient de bactéries cellulolytiques du sol, adaptées de façon plus ou moins précise au milieu digestif de l'hôte. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de transformer, *in vitro*, un type dans un autre. Il a été antérieurement démontré que la transformation des caractères de *Pl. cellulolyticum* en ceux d'une bactérie du sol était réalisable par repiquage en série linéaire et continue prolongée. Nous avons récemment mis en évidence une autre transformation : une souche, isolée chez le cobaye, présentant les caractères suivants : nécessité d'un facteur adjuvant de croissance, anaérobiose stricte, chromogénèse, haploméso-

trophie transitoire, pouvoir glucidolytique autre que cellulolytique nul, a été cultivée en présence d'un corps faiblement antiseptique (phénosafranine). Elle a pris les caractères suivants qui se sont montrés stables, en dehors de l'action ultérieure de l'antiseptique : nécessité d'un facteur adjuvant de croissance, anaérobiose stricte, chromogénèse faible, haplomésotrophie complète, pouvoir glucidolytique autre que cellulolytique. Ces caractères correspondent à ceux d'une souche antérieurement trouvée dans la nature (fèces humaines). Il est à noter que ces deux transformations, observées *in vitro*, se sont faites dans le sens d'une perte plus ou moins accentuée des modifications adaptatives au milieu intestinal de l'hôte.

LES LIPOÏDES ACÉTONO-SOLUBLES DANS LE SÉRODIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS PAR FLOCCULATION — LE RÉACTIF A.B.F.

par GÉRARD ROBYN.

(*Institut Pasteur de Bruxelles.*)

Les lipoides acétono-solubles, qui constituent le déchet de la fabrication de l'antigène Bordet-Ruelens, manifestent parfois une sensibilité plus grande quand il s'agit de déceler des cas de syphilis nerveuse, héréditaire ou latente au cours d'un traitement. Cependant, ils ne se sont pas imposés pour le sérodiagnostic de la syphilis par fixation de l'alexine. En effet, à côté des avantages précités, ils présentent trois inconvénients principaux.

1° Leur pouvoir anticomplémentaire est très marqué.

2° Leur spécificité n'est pas toujours d'une rigueur suffisante.

3° En comparant les résultats positifs obtenus au moyen d'un extrait acétonique d'une part à ceux obtenus avec un extrait alcoolique d'autre part, on observe dans bien des cas que le blocage de l'alexine est plus net avec le second réactif qu'avec le premier.

Ces inconvénients semblent plutôt dépendre de l'emploi de la méthode de fixation de l'alexine comme révélateur du complexe antigène-réagine. On pouvait dès lors se demander si les avantages des lipoides acétoniques ne pouvaient être utilisés avec profit dans une réaction directe où la liaison « antigène-réagine » se trahit par une flocculation visible à l'œil nu. Pour arriver à ce résultat, il a fallu rechercher quelles sont les conditions optimales de dispersion et de stabilité colloïdale de l'émulsion préparée par

dilution directe de la solution acétonique de ces lipoides, qui répondent aux qualités principales qu'on exige d'un bon antigène; fine sensibilité et stricte spécificité. Ces conditions dépendent à la fois de facteurs physiques, tels la vitesse de dilution, l'agitation, la chaleur, le pH, le vieillissement, et de facteurs physico-chimiques, tels la concentration en lipoides, la présence d'ions salins, l'intervention de colloïdes stabilisants, l'équilibre entre certains groupes de lipoides dont les uns sont favorables, les autres défavorables à la floculation spécifique de l'émulsion. Lorsque ces conditions sont réalisées, on obtient déjà des résultats intéressants avec la fraction acétonique de l'antigène Bordet-Ruelens.

Si l'on compare les lipoides acétoniques du cœur de différents animaux : veau, bœuf, mouton, cheval, lapin au point de vue de leur aptitude de floculer spécifiquement en présence de sérum syphilitique, on observe des variations très nettes suivant l'origine de l'organe. Dans les mêmes conditions, les cœurs de mouton, de cheval et de lapin fournissent un meilleur réactif que ceux de veau et de bœuf ; seulement, en utilisant le cœur de mouton, on rencontre parfois des réactions aspécifiques que les autres extraits étudiés ne donnent pas. A côté du cœur, le foie est également capable de fournir des extraits acétoniques très actifs. Fait curieux, lorsqu'on étudie parallèlement les résultats obtenus en confrontant une série de sérums positifs avec des extraits de foie d'une part et des extraits de cœur d'autre part, on est frappé de voir combien certains sérums floculent mieux l'extrait de cœur que l'extrait de foie, tandis que d'autres se comportent d'une façon diamétralement opposée. Il va sans dire que nous avons examiné s'il y avait une relation de cause à effet entre le stade de la maladie et l'aptitude du sérum du malade à réagir en présence, soit d'un extrait de cœur seul, soit d'un extrait de foie seul, soit des deux extraits à la fois. Nous n'avons cependant rien trouvé de semblable. Comme on pouvait s'y attendre, il suffit de faire un mélange des extraits des deux organes pour obtenir une floculation avec tous les sérums positifs.

L'ensemble des considérations qui précèdent nous a amené à préciser la préparation du réactif A.B.F. (Antigène-Bruxelles-Floculation), qui est un mélange de lipoides acétoniques de cœur et de foie de cheval. Les statistiques provenant de l'étude comparative des résultats obtenus par la réaction de Bordet-Wassermann et la réaction A.B.F. avec 18.000 échantillons de sérum nous ont montré :

1° Dans les cas de syphilis non traités, la réaction A.B.F. est généralement plus sensible que la réaction Bordet-Wassermann ; pour la syphilis primaire, elle est plus précoce ; pour la syphilis secondaire, elle accuse une supériorité nette ; mais la différence est surtout marquée dans la syphilis tertiaire, le tabes, la

paralysie générale et l'hérédo-syphilis. Fait caractéristique, le réactif A.B.F. ne donne qu'un pourcentage minime de réactions douteuses avec les sérums de malades non traités.

2° S'il s'agit de syphilis traitée, sa supériorité sur la fixation de l'alexine est encore plus manifeste, car en pareil cas elle fournit deux fois plus de résultats positifs que la réaction Bordet-Wassermann.

3° Sa spécificité est remarquablement stricte.

INDICATIONS

DE LA CUTIRÉACTION A LA TOXINE DIPHTÉRIQUE A POUVOIR TOXIQUE ÉLEVÉ

par TH. REH.

(Institut d'Hygiène, Genève.)

Dès 1934, nous avons préconisé le remplacement de l'intradermo-réaction de Schick par la cuti-réaction à la toxine diphtérique à pouvoir toxique élevé, procédé plus simple à résultat plus rapide (quarante-huit heures) et d'interprétation plus facile (pas de pseudo-réactions).

Nous ne reviendrons pas ici sur sa technique déjà décrite ailleurs [1] ni sur sa concordance avec la réaction de Schick, concordance confirmée par les travaux de Nélis et Vandenhouten [2], de Ruelle [3], de Hebrant [4] et de Tron [5].

Nous voudrions insister simplement sur les services qu'elle peut rendre dans le domaine de la lutte contre la diphtérie.

D'exécution plus simple puisqu'elle ne comporte que le dépôt d'une goutte de toxine pure sur une scarification cutanée et d'interprétation plus facile, vu l'absence de pseudo-réaction, elle se prête mieux que le Schick au contrôle en série de l'immunisation vaccinale.

De même les parents l'accepteront plus facilement que le Schick comme moyen de discrimination des enfants à vacciner.

De lecture plus rapide que le Schick, la réaction apparaissant dès le second jour, elle peut servir de cuti-diagnostic pour différencier une angine à Löffler d'une angine banale chez des porteurs de bacilles diphtériques et par là même de cuti-pronostic [5 et 6].

Donnant lieu à la pénétration d'une minime quantité de toxine dans l'organisme, elle exerce un certain pouvoir antigène susceptible parfois de négativer chez les vaccinés un Schick redevenu positif ou d'immuniser, par sa répétition, des individus non vaccinés [7].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] REH (Th.). La cuti-réaction à la toxine diphtérique, évolution, technique, interprétation. *Revue médicale de la Suisse romande*, 25 mai 1934, p. 154 ; *Ibid.* La cuti-réaction à la toxine diphtérique, sa valeur, ses indications. *Ces Annales*, 55, septembre 1935, p. 380.
- [2] NELIS (P.) et VANDENHOUTEN. La cuti-réaction à la toxine diphtérique. *Comptes rendus des séances de la Société de Biologie*, 121, 8 février 1936, p. 524.
- [3] RUELLE (G.). Contribution au contrôle de la vaccination antidiphtérique. *Bruxelles Médical*, n° 21, 22 mars 1936 ; Contribution à l'étude de l'immunité diphtérique du nourrisson *Bruxelles Médical*, n° 50, 10 octobre 1937 ; La réaction de Reh dans la recherche en clinique des sujets réceptifs à la diphtérie. *Bruxelles Médical*, n° 6, 12 décembre 1937.
- [4] HEBRANT. Le service médical à l'Institut Sainte-Ode. *Revue belge de pédiatrie*, n° 4, décembre 1936, p. 148.
- [5] TRON (Giorgio). Reazione di Schick e Reazione di Reh nella valutazione dello stato immunitario verso la diphterie. *Terapia*, février 1937. — TRON et TORELLI. Réaction de Schick et réaction de Reh, tests de réceptivité et d'immunité vis-à-vis de la diphtérie. *La Presse Médicale*, n° 12, 10 février 1937.
- [6] REH (Th.). Le diagnostic de la diphtérie chez les vaccinés. *La Presse Médicale*, n° 48, 16 juin 1937.
- [7] REH (Th.). Essais de vaccination antidiphtérique chez l'homme par insertions cutanées répétées de toxine diphtérique à pouvoir toxique élevé. *Revue d'Immunologie*, n° 4, 1938.

M. Darzins. — Est-ce que la cutiréaction à la toxine diphtérique est quantitative ?

VARIATIONS DU CARACTÈRE « ANTIGÈNE DE FORSSMAN »

par ERNEST RENAUX.

On sait (Doerr et Pick, divers) que l'injection au lapin d'une émulsion de rein de chien détermine la formation d'une hémolysine active sur les globules rouges de mouton. Corrélativement, le sérum hémolytique obtenu par immunisation du lapin contre les globules rouges de mouton floccule les lipoides extraits du rein de chien et des organes dits « Forssman positifs ».

Cependant, à deux reprises, nous avons obtenu des lipoides de rein de chien non flocculables par le sérum hémolytique lapin-mouton. Il importait de rechercher la cause de cette anomalie et,

guidé par certains indices, nous avons été amené à rechercher l'influence de la pancréatectomie sur le caractère « Forssman positif » du rein de chien.

Un chien mâle de 7 kilogrammes est soumis à la néphrectomie gauche (1). Le rein extirpé est divisé en deux portions dont l'une, broyée et émulsionnée dans l'eau salée à 9 p. 1.000 est injectée à un lapin n° 1 tandis que l'autre est traitée suivant la technique indiquée par J. Bordet et E. Renaux pour l'extraction des lipoides.

Douze jours après la néphrectomie, le chien paraît rétabli ; on enlève le pancréas. Quatre jours plus tard, la glycémie étant de 5 gr. 10, l'animal est sacrifié et on prélève le rein droit qui est, comme le gauche, divisé en deux portions ; l'une est injectée à un lapin n° 2 tandis que l'autre est soumise à l'extraction des lipoides.

Les lapins 1 et 2 sont saignés dix jours après la dernière injection d'émulsion de rein et le sérum est inactivé par chauffage de trente minutes à 56°. L'essai du pouvoir hémolytique montre que, tandis que le sérum du lapin n° 1 injecté de rein de chien normal exerce une action hémolytique presque instantanée sur les hématies de mouton en présence d'alexine, par contre, le sérum du lapin n° 2 injecté de rein de chien dépancréaté ne donne qu'une hémolyse très imparfaite après quatre heures dans les mêmes conditions expérimentales.

D'autre part, alors que les lipoides extraits du rein normal sont floculés complètement et instantanément par le sérum hémolytique lapin-globules rouges de mouton, les lipoides extraits du rein de l'animal dépancréaté ne sont que très lentement et très imparfaitement floculés par le même sérum.

Notons enfin que l'atténuation du caractère « Forssman positif » chez l'animal dépancréaté ne se limite pas au rein. Elle s'étend à d'autres organes : cœur, rate et foie notamment.

M. **Boivin** souligne l'intérêt du rapport, indiqué par M. Renaux, entre la richesse des tissus animaux en antigène de Forssman et le métabolisme glucidique. M. Boivin rappelle : 1° que les recherches de K. Meyer et de Morgan ont conduit à identifier l'antigène de Forssman du bacille de Shiga avec l'antigène glucido-lipidique de cette bactérie, et 2° que les recherches de Delafield et collaborateurs et celles de Boivin et Mesrobian ont montré que les antigènes glucido-lipidiques des bactéries perturbent profondément la régulation glycémique lactacidémique des animaux et qu'ils modifient beaucoup la respiration tissulaire en présence des substrats ternaires.

(1) Notre collègue et ami La Barre (Jean) a bien voulu se charger des interventions chirurgicales sur les chiens. Nous l'en remercions bien cordialement.

MÉNINGITE A *CORYNEBACTERIUM PSEUDO-DIPHTERICUM*

par JEAN STEINMANN.

(Service Chirurgie de Genève. Directeur : Prof. JENTZER.)

Un homme de soixante-deux ans, ayant subi un traumatisme crânien le 14 mars 1937, se présente à la clinique chirurgicale de Genève pour des séquelles consistant principalement en céphalées et vertiges. Une ponction lombaire faite le 19 janvier 1938 donne : albumine 0,26, sucre 0,60, chlorures 7,11, éléments 0,3 ; une ponction ventriculaire, le 28, un liquide sans signes inflammatoires, des deux côtés.

Sur le vu des radios, le diagnostic d'hydrocéphalie due à une leptoméningite de la fosse postérieure est posé et le malade est opéré le 9 février.

Cinq jours après l'opération se déclare une méningite alarmante avec température à 40°2; une ponction lombaire, le 15 Novembre 1938, montre un liquide purulent avec de nombreux polynucléaires, une albumine à 2,24, avec des bâtonnets Gram +, parfois en V ou en palissade, pour lesquels on pose le diagnostic de *Corynebacterium pseudo-diphthericum*.

L'état inquiétant persiste quelques jours, une ponction lombaire le 18 Novembre 1938 montre le même *Corynebacterium*, mais en partie phagocyté.

A partir de ce moment l'état s'améliore, aidé par un auto-vaccin et le malade entre en convalescence.

Le germe responsable de cette méningite, considéré habituellement comme un saphrophyte sans pouvoir pathogène pour l'homme a cependant été reconnu d'une manière indiscutable comme agent de certains accidents purulents. Tout récemment, J. Affolter a réuni une bibliographie de cas de mastite, de pyélite, d'abcès où il était le seul germe responsable, et d'autres cas où son rôle d'agent associé semblait indiscutable.

Martin Tesdal, en 1934, l'a isolé plusieurs fois dans un cas de méningite, et en 1935, H.-J. Gibson le retrouve dans le liquide céphalo-rachidien d'une lepto-méningite à évolution fatale.

Le germe que nous avons isolé en collaboration avec le Dr Alfred Nicole se montrait sous la forme de courts bâtonnets trapus, un peu ovoïdes, simulant parfois une coque ovoïde, ayant une tendance marquée à se grouper parallèlement en faisceaux, plus rarement à se mettre en V.

Il gardait le Gram, même en prolongeant la décoloration par l'alcool ; il n'était pas alcool-acido-résistant.

Une coloration par la méthode de Neisser révélait la présence

de granulations métachromatiques le plus souvent fines, bipolaires parfois uniques, plus rarement au nombre de trois.

La culture sur agar donnait un enduit crémeux, blanc, très abondant, en bouillon un trouble léger.

Il ne faisait fermenter ni le glucose, ni le lactose.

Pas de réduction du rouge neutre.

Pas de liquéfaction de la gélatine, ni du sérum coagulé.

En eau peptonée : léger louche, pas d'indol, pas de mobilité.

Ajoutons que le professeur Galli-Valerio, de Lausanne, a confirmé notre diagnostic avec une obligeance dont nous le remercions vivement.

Contrairement au germe semblable trouvé par Martin Tesdal et à celui de H.-J. Gibson, les essais d'inoculation au cobaye sont restés négatifs, ne produisant même pas d'œdème au point d'injection ; il en fut de même de l'instillation dans le sac conjonctival du lapin.

Nous ne pensons pas qu'il se soit agi d'un germe particulier, mais d'un saprophyte à faible virulence, ayant profité des circonstances particulières, traumatisme opératoire, pour provoquer une méningite.

LES CHAMPIGNONS PRÉDATEURS DE NÉMATODES

(PROJECTION D'UN FILM CINÉMATOGRAPHIQUE)

par J. COMANDON et P. DE FONBRUNE.

(*Institut Pasteur, annexe de Garches.*)

Nous avons rencontré un certain nombre d'espèces de ces Champignons dans nos ensemencements (en boîte de Pétri), de la terre du jardin de l'Institut Pasteur à Garches.

Une enquête bibliographique, orientée par les renseignements qui nous furent aimablement donnés par M. le Dr M. Langeron, nous a révélé de nombreux travaux parus sur ces curieux Champignons. Ici, nous citerons seulement ceux de Zopf, 1889, de Maupas, 1915, de Drechsler, 1937, qui nous ont permis de déterminer les espèces que nous avons étudiées.

Il nous a paru intéressant d'effectuer des recherches sur la formation et le fonctionnement des organes prédateurs de ces Végétaux, en nous aidant de nos techniques personnelles, utilisant la « Chambre à huile de paraffine » (1), le micromanipulateur pneumatique (2) et la cinémicrographie.

(1) Ces *Annales*, 60, 1938, p. 113.

(2) DE FONBRUNE. *Recherches et Inventions*, n° 274, 1938, p. 33.

On peut répartir en deux groupes ces Champignons, selon le mécanisme d'action des organes prédateurs ou pièges. Les uns tendent des *collets*, les autres placent des *gluaux*, pour attraper les Nématodes dont ils font leurs proies.

Nous avons isolé, en cultures pures, deux espèces portant des *collets* ou *garrots* : *Dactylaria brochopaga* et *Dactylella bembicodes*, et deux espèces présentant des *gluaux* ou *pièges collants* : *Dactylella ellipsozona* et *Arthrobotrys oligospora* ; une cinquième espèce : *Stylopaga hadra*, forme aussi des pièges collants, mais nous n'avons pas encore réussi à la cultiver à l'état pur.

Dans nos expériences, on fait agir divers Nématodes du sol (dont nous n'avons pas encore pu déterminer toutes les espèces). Pour obtenir des lots *aseptiques* de ces Vers vivants, nous isolons des œufs qui sont traités par une solution d'eau de Javel à 10 p. 100 ; ainsi que nous l'avons publié à l'occasion d'un travail sur les œufs (3).

Plusieurs auteurs ont observé que, dans la Nature et en Cultures *in vitro*, la présence des Nématodes est nécessaire pour la production des pièges par certaines espèces. De notre côté, nous avons vu que, en cultures pures, trois de nos espèces (*Dactylaria brochopaga*, *Dactylella bembicodes* et *Arthrobotrys oligospora*) ne forment pas de piège sur leur mycélium.

Un seul Nématode aseptique, introduit dans une micro-culture pure, provoque la formation de nombreux pièges ; de plus, nous avons constaté que la présence du Nématode n'est pas indispensable : il suffit d'arroser le Champignon avec un peu d'eau dans laquelle ont séjourné certains Nématodes (même aseptiques) de la terre. Si ces Nématodes ou si cette eau activée sont préalablement portés à la température de l'ébullition il ne se produit, par contre, aucun piège.

La cinématographie montre nettement le fonctionnement des divers pièges. Dans ce court résumé, nous ne pouvons le décrire en détail, nous réservant de le faire dans une publication ultérieure.

Cependant, nous voudrions insister sur quelques observations que nos techniques ont permises.

1° Les trois cellules, constituant l'anneau des pièges *garrots*, se gonflent brusquement (en moins de 1/10 de seconde) par l'irritation de la surface tournée vers le centre de l'anneau. On assiste à la dilatation énorme de certaines vacuoles internes.

Les cellules semblent devoir éclater, elles ne sont pourtant pas lésées et, même séparées du mycélium (par micromanipulation), elles produisent des bourgeons perforants, puis des hyphes qui poussent dans le Ver capturé, et en digèrent graduellement tous les organes dont se nourrit le Champignon.

(3) C. R. de la VIII^e réunion des Physiologistes, Nancy, 1934, p. 533.

2° Les pièges collants en « boutons » de *Dactylella ellipsozona* ne peuvent adhérer qu'à des Nématodes de certaines espèces. Ils ne collent pas aux micro-instruments de verre, ni à un grand nombre de substances comme la chitine des Insectes, la surface des Oligochètes, etc...

3° Les pièges collants, en arceaux entrelacés, de *Arthrobotrys oligospora*, n'adhèrent pas, non plus, aux micro-instruments lorsqu'ils sont dans un milieu aqueux, mais si les cellules sont dans l'air (comme cela a souvent lieu dans les cultures en boîte de Pétri), ou dans l'huile (comme il arrive dans les microcultures en chambre à huile), alors les micro-instruments collent ferme et, par eux, on peut étirer de la surface une substance visqueuse, filante, élastique et durcissant rapidement.

4° *Stylopaga hadra* présente un mycélium non cloisonné (des cloisons cependant se forment pour séparer les parties mortes du Champignon et aussi les segments qui se transformeront en Arthrospore). Si, par le léger frottement d'une micro-aiguille, on irrite un point de la surface d'un filament, il se produit une excitation qui se propage dans le protoplasme à une grande distance. Elle se traduit par l'augmentation considérable de la vitesse des courants protoplasmiques et leur orientation vers le point irrité où s'accumulent bientôt les granulations entraînées.

Le contact d'un Nématode provoque une excitation analogue ; on constate de plus, au point irrité, la transsudation d'une matière visqueuse qui se durcit et rapidement scelle, pour ainsi dire, le Nématode au filament.

Les cellules des pièges en arceaux d'*A. brochopaga* (et même les cellules du mycélium voisines) sont irritables de la même façon et présentent alors aussi une accélération des mouvements des granulations protoplasmiques et leur amoncellement vers la plage irritée, par le refoulement des vacuoles. La forte excitation d'une cellule peut se transmettre aux cellules contiguës.

La projection de ces films est destinée à attirer l'attention sur ces Champignons prédateurs. Leur étude aurait, sans doute, un intérêt pratique, au point de vue agricole, pour la destruction désirée de Nématodes. Mais elle mériterait d'être aussi poursuivie dans un sens plus général par des spécialistes de la microbiologie et de l'immunologie, auxquels elle offre un matériel vivant peu connu d'expérimentation.

Les techniques, mises au point dans notre laboratoire, prouvent ici leur utilité dans les recherches cytophysiologiques.

CINQUIÈME SÉANCE

SÉANCE CONSACRÉE AUX ULTRAVIRUS

INTRODUCTION

LE PROBLÈME DES ULTRAVIRUS

par ANDRÉ GRATIA.

Il est fréquent de voir les progrès de la science s'opérer dans le tumulte des bouleversements politiques et sociaux, comme s'il existait une contagion, une sorte de virus révolutionnaire. A l'heure où le monde entier est violemment secoué sur ses bases, nous assistons dans le domaine de la biologie à une véritable révolution dont il semble que nous n'ayons pas encore mesuré toute l'étendue. C'est le vaste domaine des ultravirus qui en est le siège. Placés à l'ultime échelon des êtres vivants, ces infiniment petits représentent une série d'organismes de plus en plus simples jusqu'à n'être plus que des micelles de la grandeur de grosses molécules de protéine. Ils obéissent ainsi aux lois de la physico-chimie et deviennent accessibles à ses méthodes d'investigation. Toute la technique microbiologique en est transformée. C'est le règne des ultra-techniques. Scrutés à l'ultra-microscope ou, mieux encore, au microscope à rayons ultra-violet, précurseur du microscope électronique, les ultravirus sont passés au crible de l'ultra-filtration, sont sédimentés par l'ultra-centrifugation et soumis à l'influence des ultra-pressions et des ultra-sons. Les cultures en bouillon ou sur gélose cèdent le pas aux cultures sur tissu ou sur membrane allantoïdienne de l'œuf ; la chambre froide concurrence la chambre étuve, la neige carbonique supplante le bain-marie ; le microbiologiste dépose le fil de platine pour consulter la table de logarithmes et appelle à son aide mécaniciens, biochimistes, physiciens et cristallographes, tandis que les adeptes des sciences dites exactes, n'attachant hier encore qu'une attention distante aux sciences naturelles, se précipitent aujourd'hui sur un domaine qui s'ouvre à eux encore vierge et paré des attraits de la vie. Plus étonnante encore est la révolution dans les idées.

Au siècle dernier, après avoir détruit le mythe toujours renaissant de la génération spontanée, Pasteur édifia la théorie des germes selon laquelle les maladies infectieuses, comme les fermentations et les putréfactions, sont dues à des *germes vivants, spécifiques, autonomes, capables d'assimilation, nés uniquement de parents identiques à eux-mêmes et venus de l'extérieur*. Construite sur une base expérimentale inattaquable, confirmée par une fécondité inouïe, la théorie des germes arriva jusqu'à nous comme un dogme inébranlable.

Aussi, lorsqu'en 1898, Loeffler et Frosch découvrirent que l'agent de la stomatite aphteuse est invisible et filtrable, et que dès 1913, Lipschütz put déjà donner une liste de quarante et une maladies infectieuses semblablement dues à des agents invisibles et filtrables, on ne douta pas un instant que ces agents fussent simplement des microbes particulièrement petits dont Pasteur avait d'ailleurs prévu l'existence.

Déjà, avant cela, en 1892, Iwanowsky avait constaté que la maladie du tabac, appelée « mosaïque », était due à un agent contagieux et filtrable. Lorsqu'en 1898, Beijerinck refit la même découverte, il considéra cet agent comme un être vivant indépendant, puisqu'il était contagieux et se reproduisait abondamment de façon indéfinie ; mais se basant d'autre part sur une expérience fallacieuse, il déduisit que cet être vivant n'était pas particulière, qu'il s'agissait d'un fluide continu, diffusible, auquel il donna le nom de « *contagium fluidum vivum* ».

Pourtant, à cette notion s'opposa bientôt celle de E. Bauer qui, étudiant la panachure de certaines Malvacées, les Abutylon, la considéra, certes, comme un processus infectieux auquel il donna d'ailleurs le nom de chlorose infectieuse ; mais comme ce phénomène ne se reproduisait que par greffe, il en conclut que l'agent n'était pas un parasite, mais bien un principe directeur aberrant reproduit par la plante elle-même. A la conception exogène du « *contagium fluidum vivum* » de Beijerinck s'opposait ainsi la conception endogène d'un « *contagium fluidum inanimatum* ».

Telle est l'étanchéité des cloisons artificiellement dressées par les savants entre leurs divers domaines, que ces notions de phytopathologie furent à ce moment sans répercussion sur la pathologie animale. Aussi lorsque San Felice, en 1913, pour le *Molluscum contagiosum*, puis en 1915 pour la rage, osa imaginer que les agents de ces maladies infectieuses ne seraient pas des virus parasites vivants, mais bien des substances toxiques reproduites par les cellules elles-mêmes, cette idée parut pour le moins fantaisiste, pour ne pas dire saugrenue et A. Marie, analysant ces travaux dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur*, trouva « surprenante, pour expliquer des infections aussi facilement inoculables en série, la prétention de vouloir, de propos délibéré, se

passer de l'hypothèse d'un germe vivant ». Comment se fait-il que moins de vingt ans après, cette idée, d'ailleurs complètement tombée dans l'oubli, ait été reprise « de novo » et chaleureusement défendue par de nombreux savants, dont les plus illustres flambeaux de notre temps ?

Il faut en trouver la raison dans l'avènement d'une controverse nouvelle suscitée par la découverte du bactériophage.

Lorsqu'en pleine guerre furent faites les découvertes de Twort, puis de d'Hérelle, l'idée qu'il pourrait exister une maladie infectieuse des bactéries, l'idée pourtant simple et logique que les cellules microbiennes pourraient être parasitées par un virus au même titre que des cellules végétales ou animales, cette idée, dis-je, était si éloignée de notre horizon habituel qu'elle ne fut d'abord guère prise au sérieux. Aussi trouva-t-on peut-être plus confortable d'accepter l'idée que le bactériophage serait une diastase sécrétée par la bactérie elle-même, d'autant plus que cette conception était défendue par le maître incontesté de l'immunité humorale au moment où il recevait la plus haute consécration scientifique.

Une controverse mémorable s'établit entre partisans du virus « bactériophage », parasite exogène et partisans du « principe lytique » diastase endogène, controverse exactement semblable à celle qui opposa jadis les idées de Pasteur, d'une part, et de Claude Bernard, d'autre part, sur la fermentation du raisin.

Mais, entre temps, se révélaient entre le comportement des virus et celui du bactériophage des analogies que l'on ne pouvait plus nier, et telle était l'influence des idées de Bordet que l'on se demanda non plus si le bactériophage était ou non un virus exogène vivant, mais bien, retournant la question, si les virus n'étaient pas, comme éventuellement le bactériophage, un produit cellulaire endogène. Et c'est ainsi que Doerr, principalement, ressuscitant la théorie de San Felice, considère les virus et les bactériophages comme des toxines troublant le métabolisme cellulaire et reproduites par les cellules malades elles-mêmes en conséquence de ce trouble.

Voilà comment la controverse du bactériophage, s'étendant au domaine des ultravirus, ceux-ci sont impliqués dans le vieux dilemme ressuscité une fois de plus entre la conception exogène et la conception endogène. Pour compléter le rappel du passé, de même que jadis Helmholtz a pu penser que la fermentation était due à des germes vivants exogènes, et la putréfaction à des principes diffusibles endogènes, certains auteurs veulent arbitrairement diviser les virus filtrables en deux groupes constitués les uns par des organismes vivants exogènes et les autres par des substances inorganisées endogènes. Cette division a été notamment suscitée par l'étonnement éprouvé par certains auteurs tels que Elford, devant l'extraordinaire petitesse des ultravirus les plus

ténus dont les dimensions peuvent être inférieures à celles de molécules de protéine, l'hémocyanine par exemple.

Une telle division, en vérité, est parfaitement arbitraire. A quel ordre de grandeur, en effet, fera-t-on la cassure ? Est-il possible de penser que le virus de la stomatite aphteuse, parce que le plus petit et n'ayant que 10 μ de diamètre, serait inanimé et endogène alors que ceux de la stomatite vésiculaire et de l'herpès seraient vivants et exogènes, parce qu'ayant respectivement 100 et 200 μ . Si encore il existait d'autres critères concordants ; mais, bien au contraire, de semblables divisions ont été proposées par d'autres auteurs sur des bases tout à fait différentes et qui, non moins arbitraires, bouleverseraient la distinction basée sur la taille. En vérité, ainsi que Bechold l'avait déjà fait remarquer, il existe une parfaite continuité entre toute la gamme des virus depuis les plus gros ayant un diamètre de 100 à 200 μ jusqu'aux plus petits ayant un diamètre de 10 μ environ, ce qui, chose curieuse, est précisément l'ordre de grandeur que Léo Errera avait autrefois assigné par le calcul comme limite de petitesse aux êtres vivants. D'ailleurs personne, je crois, ne contestera l'identification que nous avons établie entre le problème des virus des plantes et celui des bactériophages et l'on verra dans notre communication faite avec Paillot que nos observations sur les virus des insectes sont semblables à celles faites sur la mosaïque du tabac. Or, qui voudra prétendre que les viroses des insectes sont fondamentalement différentes de celles des autres animaux ?

Toutefois l'origine endogène des virus est soutenue par le fait que, jusqu'à présent, l'on n'est pas parvenu à les cultiver en dehors des cellules réceptives vivantes et tout particulièrement la multiplication du bactériophage est tributaire de la multiplication du microbe sensible. C'est d'ailleurs un fait général, et je crois inutile de rappeler à cet égard les recherches de Levaditi et Nicolau sur la multiplication intense de la vaccine dans l'épithélium malpighien en voie de prolifération et dans les tumeurs épithéliales. Mieux encore, il existe des bactéries qui, tout en paraissant normales, entretiennent en abondance du bactériophage très actif pour d'autres souches voisines. On dirait vraiment que chez ces souches dites « lysogènes », découvertes à la fois par Lisbonne et Carrère et par Gildemeister, le bactériophage est un produit de l'activité normale du microbe et représente l'arme physiologique de quelque phénomène d'antagonisme microbien. Mais, d'autre part, en poursuivant des recherches sur le caractère antigénique du bactériophage, nous avons constaté avec Jaumain, tout d'abord, qu'il existait pour des microbes d'espèces différentes, comme le *B. Coli* et le *Staphylocoque*, non pas un seul bactériophage, comme le prétend d'Hérelle, mais bien des bactériophages antigéniquement différents ; puis simultanément

ment Bruynoghe pour le B. typhique et moi-même pour le staphylocoque avons constaté que pour une même espèce microbienne, mieux encore pour un même microbe, il existait de nombreux bactériophages antigéniquement différents. Or, en les faisant se reproduire sur une même souche microbienne, ces bactériophages différents ne convergeaient pas vers un type unique ayant reçu la marque du microbe qui le reproduisait, mais, au contraire, conservaient indéfiniment, malgré de multiples passages, leurs caractères d'origine comme des entités spécifiques, parfaitement autonomes exactement comme les germes pastoriens ou encore comme les virus de l'herpès ou de la vaccine, qui sont également bien reproduits par une même cellule cutanée, selon que c'est l'un ou l'autre de ces virus qu'on lui a inoculé. Comment concilier ces deux caractères contradictoires du bactériophage d'être à la fois tributaire de la bactérie pour sa multiplication tout en restant parfaitement autonome ? Nous avons trouvé la clef du dilemme dans le problème des virus des plantes. Là aussi, on se demandait s'il n'existait qu'un seul virus pour toutes les plantes, les symptômes variant simplement selon les contingences ou bien, au contraire, s'il existait des virus différents. Avec Manil, nous avons repris la méthode sérologique et nous avons constaté que le virus de la mosaïque du tabac était non seulement antigéniquement distinct du tabac normal, comme déjà avant nous l'avait observé Helen Purdy, mais encore que ce virus était antigéniquement différent de celui de la mosaïque de la pomme de terre, ou virus X, ou de celui d'autres mosaïques, celle de la betterave, notamment ; nous avons constaté ensuite qu'un même virus, en passant sur des espèces végétales différentes conservait toujours le même caractère antigénique propre ; enfin qu'en se reproduisant sur une même plante, le tabac par exemple, des virus différents ne convergeaient nullement vers un type commun, mais que chacun d'eux conservait intact son caractère d'origine. En d'autres termes, *les virus des plantes, comme les bactériophages, se comportent comme des entités spécifiques autonomes doués d'assimilation exactement comme les germes pastoriens.*

Or, il existe chez les plantes l'équivalent des bactéries lyso-gènes, il y a des plantes « viruligènes ». Il existe des variétés de pommes de terre, d'apparence luxuriante, dont on ne trouverait pas un seul plant qui ne contienne en abondance du virus X capable de déclencher une mosaïque typique chez d'autres variétés de pommes de terre sensibles. Là aussi, on dirait qu'il s'agit chez les premières variétés d'un attribut physiologique agent de quelque antagonisme végétal. Mais, si cette propriété « viruligène » s'entretient indéfiniment lorsqu'on transplante la pomme de terre par la voie végétative, comme c'est l'habitude générale, il en va tout autrement, par contre, si on la reproduit par la voie sexuelle, comme nous l'avons fait expérimentalement, en semant

leurs graines ; dès la première génération toutes les plantules filles ont perdu cette propriété viruligène. Quoi qu'on ait voulu arguer mal à propos de cette expérience, elle nous paraît la preuve formelle, appuyée d'ailleurs par d'autres faits trop longs à rappeler dans cette brève introduction, que chez ces plantes viruligènes, le virus n'est nullement un attribut naturel endogène, mais bien un élément étranger qu'élimine la barrière de la reproduction sexuée. Fort de cet enseignement, nous avons ensuite pu constater que pour le *B. megatherium* lysogène, le bactériophage est, là aussi, un élément acquis et pathologique. En vérité, bactéries lysogènes et plantes viruligènes sont des porteurs de virus exactement comme il y a des personnes qui véhiculent sans en souffrir le virus de l'encéphalite léthargique ou celui de la polyomyélite antérieure, tout en répandant la contagion autour d'elles, exactement aussi comme l'âne peut entretenir dans son sang le virus du typhus exanthématique, sans en présenter le moindre symptôme et être un véritable réservoir de virus. Au demeurant, comment imaginer que pour exercer un problème antagonisme végétal, une plante sécrète dans l'intimité de ses tissus un agent physiologique qui aurait des propriétés antigéniques entièrement distinctes de celles de ses propres cellules, agent physiologique qui ne se transmettrait pas à la descendance par les graines et qui, pour exercer sa fonction au loin, doit passer par l'intermédiaire d'insectes, chez lesquels il subit une période d'incubation souvent prolongée ?

D'ailleurs il existe aux Etats-Unis certaines variétés de plantes identiques à celles d'Europe ; mais tandis que sur notre continent ces variétés sont atteintes de viroses, elles en sont indemnes en Amérique ; pourtant les conditions pour l'éclosion de ces viroses sont aussi favorables là-bas qu'ici, car il suffit d'y importer le virus européen pour qu'il s'y développe aussitôt. Tout cela nous montre que les virus des plantes et les bactériophages sont des agents contagieux exogènes se comportant comme des entités spécifiques distinctes des cellules végétales ou microbiennes qui les hébergent et s'y reproduisant de façon autonome, exactement comme les germes pastoriens.

Or, au moment même où, après tempêtes et marées, nous abordions enfin au havre de la certitude, voici que nous arriva d'Amérique une nouvelle sensationnelle. En appliquant les admirables méthodes par lesquelles Northrop est parvenu à cristalliser diverses diastases, Stanley a obtenu l'antigène spécifique virulent de la mosaïque du tabac sous la forme d'une protéine cristallisable. Le fait est indiscutable, il fut obtenu presque simultanément en Angleterre par Bawden et Pirie, qui de plus l'ont répété pour d'autres virus des plantes, et nous-mêmes l'avons ensuite obtenu, comme Stanley et Wyckoff, par ultracentrifugation fractionnée.

Comment concilier ce fait capital avec nos conclusions ? Sans doute vient-il à l'esprit que la protéine de Stanley pourrait ne pas être le virus lui-même, mais bien quelque épiphénomène, quelque produit de sécrétion spécifique qui entraînerait avec lui le véritable virus ; pour défendre cette hypothèse, il ne manque pas d'arguments ; aussi n'est-elle pas encore formellement éliminée. Mais je m'en voudrais de paraître me retrancher derrière une échappatoire et je veux au contraire, et de façon peut-être prématurée, admettre délibérément que la protéine de Stanley est bien le virus même de la mosaïque du tabac. D'ailleurs, tout ce qui altère son intégrité altère aussi la virulence. Nous en avons apporté nous-mêmes une preuve. Grâce à l'obligeance de Machebœuf, des échantillons de protéine de la mosaïque du tabac que nous avions préparés par ultracentrifugation ont été soumis dans l'ultrapresse de Basset à des pressions croissantes ; à l'aide de ce matériel ultracomprimé, nous avons ensuite constaté avec Manil que vers 8.000 atmosphères se trouve un point critique où la propriété antigénique, l'aptitude à cristalliser et la virulence de la protéine sont altérées de façon parallèle.

En réalité, il n'y a aucune contradiction entre la découverte de Stanley et nos conclusions. Sa protéine représente incontestablement l'antigène spécifique dont nous avons fait l'étude et se comporte donc exactement comme un germe ; et dans ses toutes dernières publications Stanley se rallie à cette opinion. Il n'y a qu'une seule conclusion logique, c'est qu'à l'extrême limite de petitesse des êtres vivants, ceux-ci sont représentés par des micelles protéiques, susceptibles par conséquent de se condenser dans certaines conditions, en s'orientant selon une architecture cristalline, et l'on voit même ce processus se réaliser au sein des cellules malades dans le cas des polyédries des insectes.

En vérité, nous devons nous habituer à cette notion à première vue choquante qu'il existe des particules vivantes cristallisables, comme l'homme s'est bien habitué un jour à la notion que la baleine n'est pas un poisson, ou encore comme on ne s'étonne plus que les sarcines forment des cubes. La présence d'une protéine spécifique a été retrouvée dans d'autres cas, et toujours il semble bien qu'il s'agisse de nucléoprotéines, que ce soit le bactériophage isolé par Northrop, le virus du sarcome de Rous isolé par Claude, ou encore le virus de la grasserie du ver à soie. Or, il s'avère de plus en plus que les nucléoprotéines représentent bien le noyau initial de l'organisation vivante, la présence du phosphore assurant le transport énergétique.

La microbiologie, née dans le laboratoire d'un chimiste illustre dont cet Institut porte glorieusement le nom, retourne à ses sources ; il n'est pas impossible que demain les chimistes nous révèlent la constitution exacte des protéines virulentes et il n'est pas interdit d'espérer qu'ils puissent ensuite en opérer la syn-

thèse, comme on a réussi celle de certaines vitamines. Ce jour-là, l'homme pourra se vanter d'avoir créé de la vie (1).

M. Wollman. — A propos du « Problème des ultravirus » : la conception des *facteurs héréditaires*, développée par nous pour rendre compte des phénomènes de la bactériologie nous a valu de la part de d'Hérelle et, à sa suite, de la part de Gratia, le reproche d'avoir fait renaître le « mythe » de la génération spontanée. Ce reproche est en réalité peu fondé.

Résolu par la négative, dans le cas des bactéries, par Pasteur, le problème de la génération spontanée ne peut se poser, de toute évidence, que pour les formes les plus primitives de la vie. Or, ce n'est certainement pas le cas des agents-virus et bactériophages qui nous occupent ici et dont l'existence est subordonnée à celle d'organismes plus élevés. Que l'on accepte l'idée d'après laquelle il s'agirait de parasites exogènes ou celle d'éléments endogènes — et chacune de ces façons de voir me paraît correspondre à des données connues — il ne saurait s'agir de formes de vie primitives. Dans le cas de parasites exogènes, la simplicité de constitution serait la suite même du parasitisme intracellulaire et, par conséquent, secondaire. Dans le cas d'éléments endogènes, donc produits par des cellules vivantes, il va de soi qu'on ne peut guère parler de génération spontanée, c'est-à-dire de la naissance de la vie aux dépens de la matière inanimée.

Je ne puis pas m'étendre ici sur les arguments qui plaident en faveur de la nature endogène des bactériophages et, notamment, de la conception des *facteurs héréditaires*. Cette façon de voir, d'après laquelle il s'agirait d'éléments possédant les attributs de la matière vivante et produits par les cellules a été émise, indépendamment, pour les bactériophages et pour certains « virus » des plantes (Duggar et Armstrong). Dans le cas de ces derniers, on a formulé certaines objections particulières.

C'est ainsi que les « virus » de quelques mosaïques sont transportés par des insectes. Or, dit-on, comment concevoir que des « gènes » soient véhiculés par des insectes ? Je ferai remarquer qu'il n'est pas certain que les divers « virus » soient des agents de même nature. Mais, même en admettant qu'il en soit ainsi et qu'il s'agisse dans tous ces cas d'éléments endogènes, l'objection me paraît peu pertinente. Le cas ne serait pas sans analogie avec la fertilisation de certaines plantes, laquelle est assurée, dans la nature, uniquement par des insectes déterminés ; en l'absence de ceux-ci, les plantes en question restent stériles.

Une autre objection porte sur le fait que, dans de nombreuses

(1) Pour la bibliographie, Cf. « La Nature des Ultravirus » dans le traité : « Les Ultravirus des maladies humaines », de C. LEVADITI et P. LÉPINE. Maloine, édit., Paris, 1938.

mosaïques, le « virus » n'est pas transmissible par les graines. Ici encore, on peut invoquer une analogie. Certains caractères héréditaires authentiques (variété de fruits, de fleurs) ne sont guère non plus transmissibles, dans la pratique, par les graines et on les entretient uniquement par greffes. Cette non transmission est ici le résultat de la disjonction mendélienne. Sans préjuger du mécanisme de la « barrière sexuelle » dans le cas de certaines mosaïques, cette analogie est uniquement destinée à illustrer le fait que la non transmission par graines n'implique pas nécessairement l'idée d'un agent exogène.

M. Manil, discutant la thèse de M. Wollman, cite quelques exemples appuyant la thèse du virus exogène : le caractère polyphage de certains virus ; la non transmissibilité par la graine, même dans le cas de virus latents ; l'abondance de certaines viroses dans certains pays à l'exclusion de certains autres, etc.

Il faut bien reconnaître que, dans l'état actuel de nos connaissances, les virus des plantes — quelle que soit d'ailleurs leur nature — se comportent comme s'ils étaient exogènes.

COMMUNICATIONS

LES « SÉLECTEURS »

par C. LEVADITI

en collaboration avec R. FASQUELLE, J. MESROBEANU, L. REINIE,
M^{me} L. STAMATIN et R. BEQUIGNON.

Il n'est de problème aussi obscur que celui des variations de la virulence de certains ultravirus, considérés sur le plan de leurs affinités tissulaires. Tel est, en particulier, le cas du vaccin jennérien et de ses deux variantes, l'une *dermotrope* (épithéliotrope), l'autre dite *neurotrope* (en réalité mésodermotrope : « neurovaccin »). Nous avons essayé de saisir le mécanisme qui préside à la genèse de cette variété neurotrope du virus vaccinal et, tout dernièrement encore, dans un mémoire paru dans ces *Annales* (1), nous avons formulé une hypothèse de travail, que nos recherches préliminaires ont semblé confirmer. Selon cette hypothèse, une souche donnée d'ultravirus ne représente pas un ensemble absolument homogène, où une parfaite équivalence

(1) LEVADITI, FASQUELLE, REINIÉ et SCHOEN. Ces *Annales*, 60, 1938, p. 142.

règne entre les divers éléments constitutifs. *En vertu d'un phénomène sélectif, où la réceptivité du système réticulo-endothélial névraxique joue le rôle d'un véritable « sélecteur », certaines souches dermovaccinales se transforment brusquement, ou petit à petit, par des passages successifs, en souches neurovaccinales. Le caractère dominant épithéliotrope du vaccin jennérien cède le pas au caractère secondaire, particulièrement mésodermotrope.*

Nous avons poursuivi ces investigations afin de préciser l'effet de la sélection en fonction des divers sélecteurs utilisés. Parmi ceux-ci, nous avons choisi :

- 1° *L'encéphale de lapin,*
- 2° *La membrane chorio-allantoïde de l'œuf incubé de poule,*
- 3° *Les cultures cellulaires, et*
- 4° *Les néoplasmes.*

I. SÉLECTEUR : *Encéphale du lapin* (en collaboration avec MM. Reinié et Béquignon).

Le sélecteur « encéphale de lapin », à la condition d'utiliser, lors de chaque passage, un assez grand nombre d'animaux, a permis de transformer le dermovaccin (souche Normandie) en neurovaccin après 5 passages effectués en l'espace de vingt-sept jours.

Les caractères du « neurovaccin », sélectionné de la sorte, sont les suivants :

- 1° Titre de la virulence par voie intracérébrale : 10—5 ;
- 2° Titre de la même virulence par voie intracutanée (après un septième passage) : 10—6.

II. SÉLECTEUR : *Membrane allantoïde* (en collaboration avec M. Mesrobian).

Levaditi et Voet (2) ont montré que la membrane allantoïde de l'œuf de poule incubé [méthode de Borrel (3) et de Woodruff et Goodpasture (4)] est un parfait sélecteur se prêtant à la transformation du dermovaccin en neurovaccin. Il nous a paru intéressant de reprendre ces recherches, afin de pouvoir comparer l'action sélective de l'encéphale du lapin à celle du sélecteur « membrane allantoïde », sur le même ultrafiltrat de la même souche de dermovaccin.

CONCLUSION. — *L'expérience a montré qu'il suffit de quatre passages successifs sur la membrane allantoïde, effectués en l'espace de quatorze jours, pour rendre une souche dermovaccinale constamment encéphalitogène pour le lapin (100 p. 100 résul-*

(2) LEVADITI et VOET. *La Presse Médicale*, n° 7, 1937, p. 113.

(3) LEVADITI. *Ces Annales*, 20, 1906, p. 924.

(4) WOODRUFF et GOODPASTURE. *Amer. J. of Pathol.*, 7, 1931, p. 29.

tats positifs), alors que la même souche était faiblement encéphalotogène au départ (33 p. 100).

Mais ne peut-on pas enregistrer des résultats semblables après un nombre de passages inférieur à quatre ? L'essai suivant semble le prouver :

EXPÉRIENCE. — Nous nous sommes servis de la même souche Normandie conservée à la glacière pendant quatre-vingt-seize jours. Eprouvée à nouveau, cette souche s'est révélée encéphalotogène pour le lapin dans 40 p. 100 des cas (virulence cutanée = 10—4). Après un premier passage sur la membrane allantoïde, l'incidence des encéphalites neurovaccinales fut de 60 p. 100, mais après un 2^e et un 3^e passage sur la même membrane, cette incidence atteint l'*optimum* absolu, soit 100 p. 100 (titre cutané : 1/1.000).

Ainsi, nul doute possible : l'efficacité du sélecteur « membrane allantoïde » est nettement supérieure à celle du sélecteur « encéphale de lapin ». La sélection s'effectue plus vite et exige un nombre restreint de sélecteurs lors de chaque passage.

III. SÉLECTEUR : *Culture cellulaire* (en collaboration avec M^{me} Stamatin).

Le fait que le virus vaccinal, cultivé *in vitro* en présence d'éléments cellulaires d'embryons de poulet, suivant les méthodes en cours [Maitland, modifiée par Plotz (5)] est encéphalotogène pour le lapin, a été récemment mis en lumière par Plotz et Lépine (6). Il est vrai que, dans ce cas particulier, la souche vaccinaleensemencée au départ était du *testi-vaccin*, donc du virus ayant déjà subi des passages sur le testicule du lapin.

D'après nos recherches actuelles, la culture du virus vaccinal dermatrope en présence de cellules d'embryon de poulet intervient, en tant que sélecteur, pour déterminer la transformation du dermatovaccin en neurovaccin. La sélection semble s'opérer avec rapidité, puisqu'on peut la constater dès la deuxième culture *in vitro*.

IV. SÉLECTEUR : *Néoplasmes* (en collaboration avec L. Reinié).

Levaditi et Nicolau (7) ont montré qu'il était possible de cultiver le neurovaccin dans certains néoplasmes épithéliomateux ou sarcomateux greffés à la souris, et précisé les conditions où cette culture s'effectue (rapports avec la nature épithéliale, ou mésodermique de la tumeur, retentissement sur l'ensemble de l'orga-

(5) Cf. pour la technique : PLOTZ, in LEVADITI et LÉPINE, *Les Ultravirus des maladies humaines*, p. 1111, Paris, Maloine, édit., 1938.

(6) PLOTZ et LÉPINE. *C. R. Soc. de Biologie*, **127**, 1938, p. 264.

(7) LEVADITI et NICOLAU. *Ces Annales*, **37**, 1923, p. 443.

nisme, immunité antivaccinale, etc.). C'était la première fois que l'on démontrait ainsi l'affinité de certains ultravirus pour les éléments néoplasiques et que l'on insistait sur les relations entre la pullulation *in vivo* de certains de ces ultravirus et l'état de mitose.

Or, les éléments néoplasiques n'ont pas semblé exercer une influence sélective sur le « *dermovaccin* ». Celui-ci se développe mal, ou ne pousse guère au contact des cellules tumorales, en sorte que (tout au moins d'après nos expériences et avec les souches néoplasiques utilisées), il n'y a pas beaucoup à espérer de la sélection que pourraient exercer ces cellules tumorales sur les éléments constitutifs du virus vaccinal.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

Sous l'influence de certains sélecteurs (tels l'*encéphale du lapin*, la *membrane chorio-allantoïde de l'œuf de poule incubé*, la *culture du virus en présence de cellules embryonnaires in vitro*), le rapport numérique $r = \frac{M}{E}$ entre les unités virulentes à affinités épithéliotropes et les corpuscules élémentaires à attirance méso-dermotrope change, M devenant supérieur à E . Les potentiels sélectifs de chacun de ces sélecteurs sont loin de représenter des valeurs équivalentes. *De ce point de vue, et par ordre de pouvoir sélectif décroissant, les sélecteurs étudiés par nous se classent ainsi : membrane chorio-allantoïde, cultures cellulaires et, pour finir, encéphale du lapin.*

Autrement dit, le résultat final, envisagé sur le plan des affinités tissulaires, est en fonction de deux facteurs essentiels :

1° *Les qualités originelles de la souche vaccinale utilisée, et*

2° *L'indice de résistance $p = \frac{D}{A}$ de l'ensemble de l'organisme, des systèmes tissulaires qui le composent, des éléments embryonnaires non encore différenciés, ou des cellules cultivées in vitro, en un mot des « sélecteurs ».*

CARACTÈRE ANTIGÉNIQUE DU VIRUS DE LA GRASSERIE DES VERS A SOIE

par A. GRATIA et A. PAILLOT.

Des lapins sont préparés à l'aide respectivement : 1° de corpuscules polyédriques isolés par centrifugation ordinaire du sérum de vers atteints de grasserie ; 2° de granules virulents

obtenus par ultracentrifugation du sérum de vers gras ; 3° de granules virulents obtenus par ultracentrifugation des tissus de vers gras ; 4° de granules virulents obtenus par ultracentrifugation des tissus de vers normaux ; 5° de sérums de vers normaux.

Le sérum antipolyèdres et les deux sérums anti-granules virulents ont des propriétés identiques : ils agglutinent en flocons, jusqu'au delà du 1/2.500, également bien les polyèdres et les granules virulents du sang ou des tissus de vers gras. Ils sont, par contre, sans action sur les émulsions de tissus de vers normaux et sur le sérum normal. Ils n'agglutinent pas non plus les corpuscules de la polyédrie de *Euxoa Segetum*.

Quant aux sérums préparés contre les grains des tissus normaux et contre le sérum de vers normaux, ils précipitent fortement ces éléments normaux, en un précipité diffus, pulvérulent, mais ils sont sans action sur les polyèdres et sur les granules virulents.

Ces observations démontrent que les granules virulents et les polyèdres ont une constitution antigénique identique, rigoureusement spécifique, entièrement distincte, par contre, de celle des antigènes normaux, comme de celle des corpuscules d'une autre espèce de polyédrie.

Le comportement antigénique du virus de la grasserie des vers à soie est comparable à celui des virus des plantes. Les corpuscules polyédriques sont constitués des particules virulentes agglomérées au sein même des tissus selon une architecture cristalline, monoréfringente (apparemment de dodécaèdre rhombique du système cubique).

ULTRACENTRIFUGATION DU VIRUS DE LA GRASSERIE DES VERS A SOIE

par A. PAILLOT et A. GRATIA.

Alors que le sang des vers à soie normaux est limpide, le sang des vers atteints de grasserie a un aspect laiteux qu'il doit surtout à la présence des inclusions cellulaires caractéristiques de la maladie, les « corpuscules polyédriques » mis en liberté dans le sang. Toutefois, débarrassé de ceux-ci par centrifugation ordinaire, le sérum, bien que devenu transparent, reste nettement opalescent et conserve sa virulence. Examiné au microscope à fond noir avec de gros oculaires, il présente une infinité de petits grains faiblement éclairés, à la limite de visibilité et animés de mouvements browniens extrêmement rapides et amples. Ces grains n'existent pas dans le sérum normal. Le sérum de vers

gras filtré sur bougies à pores larges (L2) présente encore ces granulations et reste virulent, tandis que filtré sur bougies à pores fins (L5), il ne contient plus de grains et n'est plus virulent. Ces observations faites par le premier de nous et qui montrent le parallélisme existant entre la présence de ces granules et la virulence, l'ont amené à les considérer comme l'agent probable de l'infection. Il importait toutefois d'isoler ces grains ; mais toutes les tentatives pour les séparer par les centrifugeurs ordinaires ayant échoué, nous avons eu recours à l'ultracentrifugeur de Henriot-Huguenard mis au point par le second d'entre nous.

Débarrassé de ses polyèdres par une centrifugation ordinaire, le sérum de vers gras est soumis à une ultracentrifugation de dix minutes à 60.000 t. m. (environ 60.000 g). L'opalescence due aux fins granules disparaît, ceux-ci formant au fond des tubes un culot de coloration jaune. Le liquide surnageant entièrement clair examiné au fond noir ne contient presque plus de granules et sa virulence est corrélativement très diminuée, tandis que le culot remis en suspension dans de l'eau physiologique et lavé plusieurs fois, a conservé une virulence à peu près égale à celle du témoin non centrifugé.

D'autre part, si on dissout les polyèdres dans une solution faiblement alcaline, ils disparaissent complètement à l'examen microscopique direct, mais ils se retrouvent au fond noir sous forme de masses sphériques très faiblement éclairées et contenant une grande quantité de granules identiques aux granules virulents du sérum.

L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES VIRUS DES PLANTES

par P. MANIL.

(Institut Agronomique de l'Etat, Gembloux, Belgique.)

En ce qui concerne le problème de la nature des virus des plantes, des résultats substantiels ont été acquis : citons la purification des virus de la mosaïque ordinaire du Tabac, d'une mosaïque de Cucurbitacées, du « Bushy stunt » de la Tomate. Mais les techniques applicables dans des cas déterminés ne donnent aucun résultat en d'autres circonstances. En effet, les divers virus se comportent *in vivo* et *in vitro* de façon très différente.

Le virus « type » qui a servi de matériel aux recherches les plus nombreuses est le virus de la mosaïque du Tabac, ou plus correctement de l'une des mosaïques les plus communes du Tabac. On pourrait être tenté de croire que les propriétés de la mosaïque

ordinaire du Tabac trouvent leur pendant chez les autres viroses. Cela est vrai dans certains cas, mais il serait prématuré, dans l'état actuel de nos connaissances, de vouloir généraliser. En effet, lorsqu'on compare entre eux les caractères des divers virus phytopathogènes, on est frappé par les différences qu'ils accusent.

Dès l'abord, une distinction fondamentale sépare les virus en deux grands groupes : ceux qui conservent plus ou moins longtemps *in vitro* leur caractère infectieux (virus inoculables mécaniquement aux plantes réceptives), et ensuite les virus qui perdent toute activité au sortir des cellules-hôtes.

Tels sont les virus de la nécrose du phloème, chez la Pomme de terre, des mosaïques, des Rosacées, de celle du Dahlia, le virus de la maladie du Riz appelé « Curly dwarf ». Ces viroses ne sont donc transmissibles que par greffe ou par l'intermédiaire d'insectes spécifiques.

Parmi les virus inoculables artificiellement, la longévité *in vitro* est très variable : à la température ordinaire et dans un liquide stérile, l'agent de la mosaïque ordinaire du Tabac reste actif pendant plusieurs années ; les virus X et D des Solanacées, plusieurs mois ; le virus n° 11 du K. Smith (« Tobacco necrosis »), une vingtaine de jours ; le virus de la mosaïque du Concombre de soixante-douze à quatre-vingt-seize heures ; l'agent de la mosaïque ordinaire du Haricot, les virus A et Y des Solanacées, une trentaine d'heures ; le virus de la mosaïque de la Canne à sucre, quelques heures seulement.

En milieu sec, la longévité varie aussi dans de larges limites : le virus de la mosaïque du Concombre, les virus D, X et Y des Solanacées, ceux du « Spotted wilt » et du « Bushy stunt » de la Tomate sont détruits très rapidement.

Envisageons la *température mortelle* : en suspension aqueuse et après dix minutes de chauffage, le virus de la mosaïque du Tabac est détruit à 93°, le virus du « Tobacco necrosis » à 72°, le virus X à 66°, le virus Y à 52°, la mosaïque du Haricot à 58° et le « Spotted wilt » de la Tomate à 42° seulement. Notons que divers facteurs peuvent modifier quelque peu les chiffres ci-dessus.

Dilutions extrêmes tolérées : Le jus extrait d'une jeune feuille de Tabac mosaïqué est encore infectieux après une dilution au 1/1.000.000. La dilution extrême active est de 1/100.000 pour le « Spotted wilt » et la mosaïque de la Tulipe, de 1/10.000 pour les virus X et D et celui du « Tobacco necrosis ». La mosaïque du Haricot, celle de la Betterave, le virus Y atteignent à peine 1/1.000, la mosaïque « Aucuba » de la Pomme de terre 1/200, le virus A des Solanacées 1/100, et la mosaïque de la Canne à sucre 1/10.

La résistance à certains antiseptiques diffère beaucoup d'un virus à l'autre. Le virus de la mosaïque ordinaire du Tabac, celui du « Tobacco necrosis », résistent à des concentrations élevées du HgCl_2 . Mais le virus du « Spotted wilt » est inactivé par HgCl_2 .

0,001 M. Ce dernier virus est extrêmement sensible aux agents oxydants. D'un autre côté, le virus du « Tobacco necrosis » résiste plusieurs mois à l'alcool éthylique concentré. Or, la plupart des virus des plantes sont détruits après quelques heures de contact avec des solutions alcooliques dont le titre est compris entre 50 et 75 p. 100.

La *qualité antigénique* des virus est loin d'être uniforme : les virus de la mosaïque ordinaire du Tabac, le virus X des Solanacées, sont de puissants antigènes spécifiques ; mais, par contre, la plupart des autres virus ne manifestent que des propriétés antigéniques faibles ou nulles.

La transmission des virus — et ses modalités — les caractères des lésions produites, la spécificité quant aux plantes hôtes, la filtrabilité sur des membranes de diverses porosités, les possibilités de purification, etc., pourraient nous fournir des exemples analogues. Les quelques faits cités soulignent à suffisance les différences souvent profondes qu'offrent entre eux les virus des plantes.

Ces différences sont-elles aussi profondes qu'elles apparaissent à première vue ? Sont-elles dues au virus lui-même, dont l'organisation différerait d'un agent infectieux à l'autre ? Ou sont-elles dues à des influences extérieures, comme la présence éventuelle de substances (dues au métabolisme du virus ou à la réaction de la cellule-hôte) qui pourraient jouer un rôle protecteur ?

Entre certains virus, des différences fondamentales semblent apparaître. Il est à noter néanmoins en faveur de la seconde hypothèse que certaines manipulations altèrent parfois profondément les caractères d'un virus : cristallisation du virus de la mosaïque du Tabac en modifiant certaines propriétés ; substances réductrices augmentant considérablement la longévité *in vitro* du virus du « Spotted wilt », etc.

Mais les données dont nous disposons ne permettent pas de trancher actuellement la question.

COLORABILITÉ ET MORPHOLOGIE DE QUELQUES ULTRAVIRUS MORPHOGENÈSE DES INCLUSIONS QU'ILS PRODUISENT

par S. NICOLAU.

Nous avons à l'heure actuelle une méthode de coloration satisfaisante qui permet la mise en évidence de certains ultravirus : c'est la méthode au bleu de méthyle oxalaté - fuchsine acide, dont

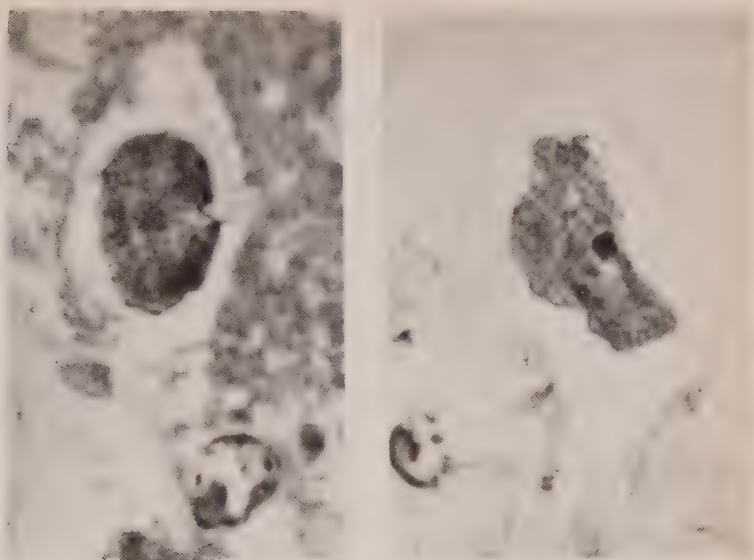


FIG. 1. — Neurones de l'écorce cérébrale de lapins morts d'encéphalite herpétique expérimentale; les noyaux des deux cellules nerveuses sont remplis d'inframicrobes herpétiques (Photo. M. Jeantet) [Gross. : 1.800 diamètres].

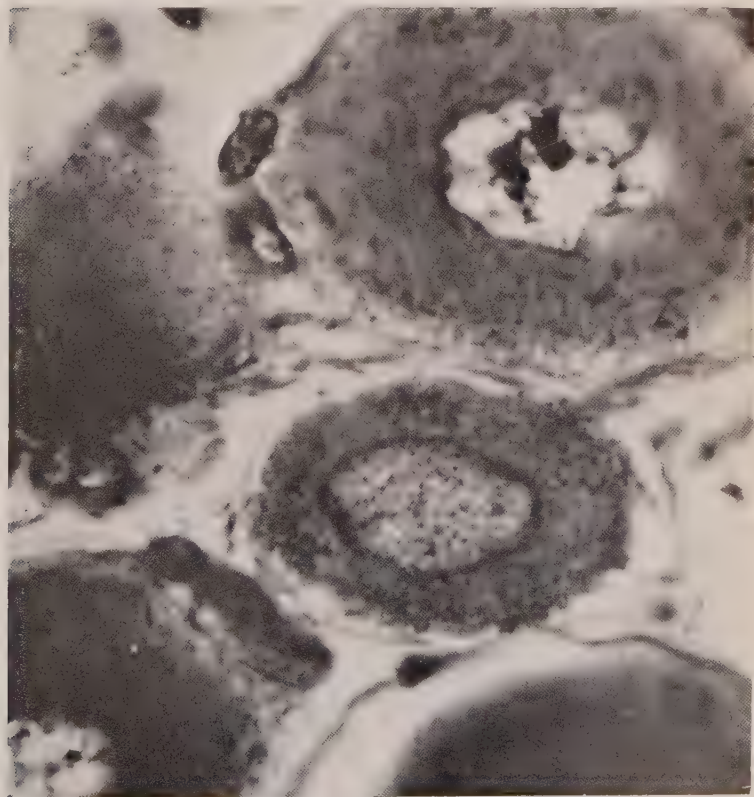


FIG. 2. — Cellules nerveuses ganglionnaires (ganglion spinal) d'un lapin mort de maladie d'Aujeszky conférée par inoculation sous-dure-mérienne; le neurone du milieu renferme des groupes d'inframicrobes dans son

la technique a été précisée dans des publications antérieures (1, 2). On colore les inframicrobes sur coupes d'organes, et, à condition d'utiliser des coupes très fines, mesurant environ $2\ \mu$ d'épaisseur, on peut distinguer, à l'aide du microscope habituel à fort grossissement, de très nombreux germes dont la forme et les dimensions sont plus ou moins caractéristiques pour chaque espèce de virus envisagée. Ces germes se trouvent presque toujours à l'intérieur des cellules, dans le cytoplasme seulement, ou dans le noyau, parfois même dans toute la cellule.

Il est à remarquer que les résultats de ces recherches morphologiques vont de pair avec ceux fournis par l'ultrafiltration, en ce qui concerne les dimensions corpusculaires des virus ; ainsi, nous avons réussi à rendre visibles des inframicrobes (herpès, maladie d'Aujeszky, rage, maladie de Borna, zona zoster, vaccine) dont la taille, précisée par l'ultrafiltration, est d'environ $150\ m\ \mu$, et n'avons jamais pu déceler des germes dans les coupes de tissus infectés avec le virus poliomyélitique ou avec le virus de la fièvre aphteuse, germes dont la taille est excessivement réduite ($8\ à\ 12\ m\ \mu$).

On comprend facilement que les inframicrobes relativement volumineux (de l'ordre de grandeur de $150\ m\ \mu$) et dont les formes les plus petites seulement traversent les ultrafiltres qui en précisent ainsi les dimensions, enrobés dans du colorant, ont les dimensions encore plus augmentées ; ils arrivent de la sorte à donner des images bien perceptibles à l'œil (images de l'ordre de grandeur de $200\ à\ 300\ m\ \mu$) et surtout bien photographiables. Les photographies, faites avec un grossissement de 1.600 diamètres sont très nettes ; en les agrandissant, on peut avoir des images encore meilleures.

Nous avons étudié de la sorte la morphologie du germe *herpétique* (2, 3) dans le cerveau, dans la peau et dans la cornée d'animaux infectés expérimentalement. La *figure 1* montre les inframicrobes herpétiques dans le noyau de cellules nerveuses de l'encéphale du lapin ; le germe se présente sous l'aspect d'un bâtonnet. Le virus *zonateux* (2), étudié dans la peau de l'homme atteint d'éruption zostérienne, est en grande partie semblable au virus herpétique. Le virus *rabique*, plus difficile à mettre en évidence que les virus précédents, est lui aussi colorable avec notre méthode. L'inframicrobe de la *maladie d'Aujeszky* (4), reproduit

(1) NICOLAU (S.) et KOPCIEWSKA (L.). *C. R. de l'Acad. des Sc.*, **204**, 1937, p. 1276.

(2) NICOLAU (S.) et KOPCIEWSKA (L.). *Ces Annales*, **60**, 1938, p. 401-431.

(3) NICOLAU (S.) et KOPCIEWSKA (L.). *C. R. de la Soc. de Biol.*, **126**, 1937, p. 211.

(4) NICOLAU (S.), CRUVEILHIER (L.) et KOPCIEWSKA (L.). *C. R. de la Soc. de Biol.*, **126**, 1937, p. 756.

dans la *figure 2*, y est représenté sous forme de cocco-bacilles ou de petits bâtonnets intranucléaires, ou encore, groupés dans le cytoplasme d'une cellule nerveuse ganglionnaire. Le virus de la *maladie de Borna* possède une forme ovale, intermédiaire entre celle du virus herpétique et celle du virus vaccinal. Enfin, le virus *vaccinal* (5), étudié dans le cerveau de lapins morts de méningo-encéphalo-myélite neuro-vaccinale, présente la forme entrevue déjà par divers auteurs, celle de *coccus*.

L'étude morphogénétique des inclusions produites par tous ces inframicrobes, montre que ces séquelles intracellulaires — cytoplasmiques ou nucléaires — sont constituées par des inframicrobes agglutinés, dégénérés, soudés en blocs arrondis dont l'affinité tinctoriale devient de plus en plus oxyphile [éosinophile] (6).

SUR UNE VARIATION PHYSIOLOGIQUE DES BACTÉRIOPHAGES

par E. WOLLMAN et M^{me} E. WOLLMAN.

On sait que dans de nombreux cas la lyse bactériophagique se trouve totalement inhibée en l'absence de Ca soluble. Nous avons constaté que cette inhibition fait régulièrement défaut lorsqu'on fait agir des bactériophages sur les souches mêmes de germes sensibles ayant servi depuis plus ou moins longtemps à leur entretien. Il semble bien qu'en dehors de l'exaltation d'activité pour la souche en question qu'on observe habituellement dans ces conditions, il se produit une variation physiologique des bactériophages portant sur leur besoin en Ca soluble.

Cette variation ne paraît pas être un simple corollaire de l'exaltation de l'activité des bactériophages. En effet, des facteurs lyso-gènes présentant en milieux pourvus de Ca⁺⁺ (gélose ordinaire) un titre lytique *maximum* peuvent se montrer totalement inactifs en l'absence de Ca soluble (gélose oxalatée).

Nous avons pu obtenir, expérimentalement, des souches de bactériophages déterminant la lyse en l'absence de Ca⁺⁺. C'est ainsi que des bactériophages entretenus depuis de nombreuses années sur *B. coli* et *B. shiga* déterminaient la lyse des germes homologues aussi bien en absence qu'en présence de Ca soluble, mais étaient actifs pour le *B. typhique* (E₂) seulement dans le premier cas. Il suffit de faire effectuer à ces bactériophages un certain nombre de

(5) NICOLAU (S.). *Bull. Acad. Méd. de Bucarest*, 1938 (sous presse).

(6) NICOLAU (S.). *C. R. de l'Acad. des Sc.*, 205, 1937, p. 753.

passages sur le *B. typhique* (en gélose ordinaire) pour les voir acquérir la propriété de lyser ce germe sur gélose oxalatée. On voit avec les bactériophages ainsi traités, apparaître tout d'abord un certain nombre de plages sur gélose oxalatée ; partant de ces plages, on obtient aisément des bactériophages qui se montrent dorénavant aussi actifs en absence qu'en présence de Ca soluble. Une étude portant sur le bactériophage du *B. megatherium* montre que cette variation apparaît de façon brusque.

Ainsi que nous l'avons établi antérieurement, la production de bactériophage par le *B. megatherium* lysogène 899 (den Dooren de Jong) se fait normalement en l'absence de Ca soluble, tandis que la lyse de la variété sensible (*B. megatherium* 338 asporogène) exige la présence d'ions de Ca. On pouvait penser que le Ca^{++} intervenait soit lors de la fixation des facteurs lysogènes sur la souche sensible, soit au cours de l'autolyse proprement dite en tant que codiastase des autolysines bactériennes. Cette façon de voir n'a pu être confirmée par l'expérience.

Nous nous sommes demandé alors si, tout comme dans les cas cités plus haut, des passages répétés par la souche sensible ne permettraient pas d'obtenir une variété de bactériophage pouvant déterminer la lyse en absence de Ca soluble. L'expérience établit qu'il en est effectivement ainsi. On voit que (projection) dès les premiers passages faits sur gélose ordinaire, par la souche sensible, il apparaît brusquement quelques éléments lysogènes capables de déterminer la lyse en absence de Ca^{++} . Quelques passages sur gélose oxalatée achèvent de fixer et d'exalter le caractère nouveau de la lyse se faisant dorénavant avec autant d'intensité sur gélose oxalatée qu'en présence de Ca^{++} .

La variété de bactériophage ainsi obtenue est reproduite avec son caractère nouveau non seulement lors de la lyse de la souche sensible, mais aussi par cette souche rendue résistante et lysogène sous son influence. En effet, alors que le *B. megatherium* 338 asporogène rendu résistant et lysogène au moyen du bactériophage ordinaire reproduit indéfiniment du bactériophage ne lysant qu'en présence de Ca^{++} , les souches rendues lysogènes au moyen de la nouvelle variété de bactériophage reproduisent celle-ci avec son aptitude à déterminer la lyse sur gélose oxalatée.

M. Chodat demande si les faits signalés dans la communication de E. Wollman et M^{me} Wollman, « Sur une variation physiologique des bactériophages », ne pourraient s'expliquer par la sélection d'éléments actifs en absence de Ca^{++} .

M. Wollman. — Nous n'avons jamais pu déceler la présence de tels éléments dans les lysats bactériophagiques dont nous partions.

ÉTUDE DES BACTÉRIOPHAGES AU MOYEN DES RAYONS X MOUS

par A. LACASSAGNE et E. WOLLMAN.

Les recherches de Holweck et Lacassagne ont montré la possibilité de calculer le volume des organites qui, dans un élément microscopique, correspond à une lésion déterminée produite par les radiations, et cela même lorsque la « cible » est au-dessous de la visibilité. Ces résultats nous ont conduits à entreprendre l'étude de l'action des radiations sur différents bactériophages. Notre premier dessein a été de rechercher les relations qu'il peut y avoir entre les dimensions des bactériophages et la probabilité de leur destruction par une irradiation.

MORPHOLOGIE DU VIRUS DE LA LYMPHOGRANULATOSE INGUINALE

par R. SCHOEN.

L'ultravirus lymphogranulomateux, agent pathogène spécifique de la maladie de Nicolas et Favre, a été unanimement considéré comme germe invisible, lorsqu'en 1935 Miyagawa et ses collaborateurs découvrent, sur frottis de tissus infectieux, des petits granulo-corpuscules caractéristiques, inclus en grand nombre dans les histiocytes, ou extracellulaires.

Les recherches de contrôle ne donnèrent, d'abord que des résultats négatifs. Par la suite, Nauck et Malamos réussissent à mettre en évidence les corpuscules de Miyagawa, en s'adressant à une souche particulièrement pathogène, nouvellement isolée d'un cas humain aigu. Toutefois, d'après ces auteurs, les granulo-corpuscules sont difficilement décelables. Ils sont généralement très rares, et leur mise en évidence est irrégulière sur frottis, tandis que les examens des coupes du même matériel infectieux fournissent des résultats totalement négatifs. Dans l'ensemble, ces dernières constatations sont, plus tard, confirmées par Herzberg et Koblmüller, par Hoffmann, Moro, entre autres, avec quelques divergences concernant la taille des granulo-corpuscules et l'interprétation de leur nature.

Nos recherches personnelles, se rapportant à ce sujet, ont établi un fait nouveau, qui explique, en grande partie, les résultats discordants des chercheurs précédents.

1. DÉVELOPPEMENT DES CORPUSCULES DANS LE NÉVRAXE DES SOURIS BLANCHES. — La mise en évidence des corpuscules caractéristiques, sur coupe du système nerveux central des souris inoculées par voie transcrânienne avec le virus de la maladie de Nicolas et Favre, est constante, à la condition de s'adresser à une souche hautement pathogène, et de procéder aux examens microscopiques dès les premiers jours après l'infection. Quelle que soit la provenance du virus utilisé, des essais multiples, effectués sur un grand nombre d'animaux, ont fourni des résultats rigoureusement comparables. Les corpuscules apparaissent, dès le deuxième jour après l'inoculation, sous forme de petits grains, ronds et bien définis, de 0,2 à 0,3 μ , environ. Ils précèdent ainsi la grosse réaction inflammatoire du système mésodermique de l'axe cérébro-spinal, qui caractérise les altérations histopathologiques de la lymphogranulomatose inguinale expérimentale. Ces corps très réguliers, colorés en bleu-violet pâle par la méthode de Giemsa, et en bleu ciel soutenu par la triple coloration d'Unna, forment, au début, des petits kystes, inclus dans les éléments épendymaires, qui bordent les parois ventriculaires, ou dans le prolongement cytoplasmique de ces cellules, parfois assez loin de leur emplacement initial. Ensuite, les corpuscules se multiplient très rapidement, et les kystes qui les hébergent deviennent de plus en plus volumineux, pouvant atteindre des dimensions considérables. Au moment où les lésions lymphogranulomateuses sont bien accusées, vers le sixième-huitième jour, les corpuscules semblent devenir plus fins, légèrement allongés, la plupart tassés à la périphérie, auquel cas les kystes apparaissent vides au centre. A la même période, on observe, d'autre part, près des kystes éclatés, des corps libres, groupés en amas dans les espaces intercellulaires. Les granules libres s'agglutinent souvent, en produisant des formations plus volumineuses et irrégulières. A une phase ultérieure, le processus évolutif est nettement plus accentué. On ne distingue plus chaque corpuscule individuellement, mais on constate de nombreuses vacuoles vides, ou, plus rarement des masses colorées uniformément, vestige des formes agglutinées. Aux stades chroniques, plus tardifs, malgré les altérations inflammatoires intenses et une persistance de la virulence, on ne décèle aucune formation particulière, pouvant être rapprochée des corpuscules existant au début de l'affection.

2. MISE EN ÉVIDENCE DES CORPUSCULES DANS LES NÉOPLASMES SARCOMATEUX, CONTAMINÉS AVEC LE VIRUS LYMPHOGRANULOMATEUX. — Dans un travail récent, nous avons démontré que les éléments sarcomateux de souris, en voie de prolifération, constituent un excellent milieu de culture *in vivo* pour le germe de la maladie de Nicolas et Favre.

Or, si les corpuscules de Miyagawa, suivant le stade évolutif de l'affection, représentent réellement une phase visible de l'agent

étiologique de la lymphogranulomatosé inguinale, il faudrait nécessairement retrouver ces corps dans les tissus néoplasiques, où la pullulation du germe est fort accusée. Pour élucider ce problème, nous avons pensé rechercher les corpuscules dans de jeunes greffons sarcomateux, contaminés avec le virus, car les néoplasmes bien développés, comme il a été établi antérieurement, ne présentent pas d'inclusions spécifiques.

Or, en procédant aux examens microscopiques du tissu néoformatif infectieux, dès les premiers jours après la greffe, nous avons pu mettre en évidence, en grand nombre, des corpuscules caractéristiques, enkystés dans les éléments tumoraux, ou groupés en véritables colonies dans le tissu interstitiel.

Quelles que soient les conditions expérimentales, soit en mélangeant le virus *in vitro* aux fragments sarcomateux, soit en contaminant le néoplasme *in vivo*, par inoculation intratumorale, ou par voie indirecte (infection transcranienne des animaux et greffe sous-cutanée, simultanée, de sarcome) on observe régulièrement le même phénomène : les corpuscules ronds et bien définis, décelables dans les zones néoformées de jeunes greffons, de quatre à six jours, deviennent, par la suite, plus fins, bacilliformes et disparaissent progressivement à partir du moment où la tumeur commence à se nécroser. Au cours des passages sous-cutanés successifs effectués avec de tels néoplasmes dépourvus de corpuscules, mais, néanmoins, très infectieux, on constate la réapparition des corpuscules caractéristiques dans les jeunes éléments néoformés, avec un nombre de cellules contaminées très élevé. Dans certains cas, presque tous les éléments sarcomateux sont remplis de corpuscules ; quelques-uns renferment même plusieurs kystes. On observe également de nombreuses formes libres, souvent agglutinées en masse, dans les espaces intercellulaires. Les contrôles de la virulence lymphogranulomateuse de ces greffons, par inoculation transcranienne aux souris, ont fourni des résultats constamment positifs.

La présence constante de ces corps dans les jeunes néoplasmes virulents, suivie d'un accroissement manifeste du nombre d'éléments tumoraux contenant des corpuscules, au cours des passages en série, d'une part, et l'absence de ces formations, d'autre part, dans les multiples recherches de contrôle, plaident, à notre avis, en faveur du rôle pathogène spécifique des corpuscules de Miyagawa dans la maladie de Nicolas et Favre, représentant un stade visible du germe lymphogranulomateux, ultrafiltrable.

3. LES CORPUSCULES LYMPHOGRANULOMATEUX CHEZ LE COBAYE. — L'infection sous-cutanée du cobaye, caractérisée par une réaction inflammatoire locale, est aussi suivie d'un développement des corpuscules typique. Au début de l'organisation de la réaction, on trouve de nombreux corpuscules ronds et réguliers, enkystés dans les éléments conjonctifs étoilés, entre les lamelles du tissu sous-

cutané lâche, et des formes libres groupées en amas dans la substance fondamentale. Avec la progression du processus infiltratif, on observe les mêmes altérations morphologiques des corpuscules lymphogranulomateux qu'on constate dans l'infection névraxique et les tissus sarcomateux, contaminés avec ce virus.

CONCLUSIONS. — La mise en évidence des corpuscules de Miyagawa, dans la lymphogranulomatose inguinale expérimentale, est en relation étroite avec la période d'incubation de la maladie. L'aspect morphologique de ces corps semble être nettement déterminé par le stade évolutif de la réaction tissulaire locale.

Quel que soit le matériel virulent, système nerveux des souris, tumeurs sarcomateuses de souris, nodules inflammatoires chez le cobaye, on constate des corpuscules ronds et réguliers au cours des premiers jours qui suivent l'inoculation. Aux phases ultérieures, parallèlement avec le développement de l'affection, on observe constamment des altérations morphologiques de ces corpuscules et leur disparition progressive du tissu atteint, lequel persiste, néanmoins, à être manifestement infectieux.

M. Gavrilov. — A l'Institut d'Hygiène d'Anvers (directeur : De Moor), M^{me} A. Fester et moi-même avons fait des expériences avec le virus de la maladie de Nicolas et Favre, reçu du professeur Nauck, de Hambourg. Nous avons constaté l'identité de nos résultats avec les siens et nous avons pu, non seulement cultiver ce virus sur l'explantat *in vitro* de la cornée de lapin, mais aussi constater les différents stades d'évolution du virus dans le protoplasme des cellules, qui présente des formations ayant l'aspect typique des corpuscules élémentaires de Miyagawa. Nous avons également pu étudier quelques-unes des propriétés spécifiques de ce virus chez les chiens infectés.

APPLICATION DE LA DÉVIATION DU COMPLEMENT A L'ÉTUDE DE LA MÉNINGITE LYMPHOCYTAIRE

par P. LÉPINE, P. MOLLARET et M^{lle} V. SAUTTER.

L'étude clinique et expérimentale de la méningite lymphocytaire causée par le virus chorioméningitique nous a incités à rechercher un test de laboratoire qui fût sensible, spécifique et d'apparition précoce au cours de l'infection. En effet, l'existence d'un pouvoir neutralisant dans le sérum des malades, dont nous avons pu vérifier par ailleurs la présence, est inconstante, tardive et souvent fugitive, et les résultats donnés par ce test sont soumis aux délais d'observation d'animaux, délais augmentés par la nécessité d'un contrôle histologique.

Nous avons, au contraire, obtenu les meilleurs résultats par la méthode de déviation du complément, malgré l'insuccès habituel de celle-ci dans les affections à virus.

Le sérum inactivé des malades ou des animaux est mis en présence d'un antigène constitué par une émulsion au centième, filtrée sur papier, de poumon finement broyé de cobaye ayant succombé à la chorioméningite.

Le poumon du cobaye, prélevé à l'autopsie de l'animal sacrifié agonisant, présente l'aspect typique de la maladie : hépatisation de teinte lilas à peu près généralisée. Bien que d'autres organes puissent renfermer des quantités plus élevées de virus que le poumon, c'est ce dernier qui s'est montré le seul utilisable ; il n'est pas anticomplémentaire et pour un poids faible de tissu il montre un pouvoir antigénique élevé. L'antigène préparé se conserve bien à la glacière. Le poumon normal ne dévie pas le complément.

La réaction est pratiquée suivant la technique et avec l'échelle de Calmette et Massol, suivant laquelle une déviation de 5 unités alexiques, ou moins, est sans valeur, une déviation de 10 unités est positive, et une déviation de 15 unités est assez fortement positive.

48 déviations ont été pratiquées avec le sérum de 16 sujets ayant reçu expérimentalement (1) une inoculation de virus de la chorioméningite (souche Paris) : chez tous les malades, la réaction est devenue positive, en général à partir du onzième jour de l'inoculation. Les taux moyens atteints ont été de 25 à

(1) P. LÉPINE, P. MOLLARET et B. KREIS. *C. R. Acad. des Sci.* **204**, 1937, p. 1846.

30 unités ; le maximum a été de 120 lors de la réinoculation d'épreuve d'un malade, qui n'a présenté par ailleurs ni fièvre, ni signe clinique, sauf un amaigrissement incontestable. La réaction a été trouvée fortement positive jusqu'au cent trente-deuxième jour, faiblement positive jusqu'au cent soixante-douzième jour. Elle a été constamment négative après le cent quatre-vingt-dix-neuvième jour. Elle s'est montrée négative avec le liquide céphalo-rachidien des malades, quel que soit le moment de l'examen.

Par ailleurs, le sérum de 18 malades pour lesquels le diagnostic clinique de méningite lymphocytaire avait été posé a été examiné ; 6 de ces sérums ont pu en même temps être inoculés à l'animal. Un sérum a fourni un résultat totalement négatif (déviation et inoculation) ; 4 sérums ont donné des résultats positifs à la fois par la déviation et par l'inoculation aux animaux ; 1 sérum a donné une déviation faiblement positive, avec inoculations négatives. Enfin, 12 sérums prélevés trop tardivement ou dans des conditions défavorables, ont été examinés par la déviation seule. Ils ont donné 9 résultats fortement positifs, 2 positifs faibles, 1 négatif.

En outre, 64 sérums témoins ont été examinés avec des résultats négatifs. Parmi ceux-ci, 3 étaient ceux d'individus normaux, mais manipulant des animaux infectés, 18 provenaient de malades atteints d'affections du système nerveux, parmi lesquelles des méningites de toutes formes, et 43 de malades atteints d'affections diverses : pour ces derniers, il y avait 13 malades fébriles au moment de la prise du sang et 13 syphilitiques à réactions fortement positives.

Enfin parmi les animaux inoculés de chorioméningite, 6 singes ont tous donné des réactions fortement positives (jusqu'à 175 unités), 8 lapins ayant reçu le virus de Paris ou des souches étrangères, ont tous réagi (15 à 40 unités suivant la souche), mais 12 cobayes ont fourni des résultats constamment négatifs.

Nous croyons que la déviation du complément appliquée à l'étude de la chorioméningite en facilitera le diagnostic et aidera au dépouillement du chapitre encore confus des méningites lymphocytaires.

RÉPARTITION DES ANTICORPS NEUTRALISANTS DANS LES TISSUS DES ANIMAUX IMMUNISÉS CONTRE LA VACCINE

par J. VIEUCHANGE.

L'existence d'anticorps neutralisants dans le sérum des animaux immunisés contre la vaccine est un fait bien établi. Mais n'est-il pas possible de retrouver ces anticorps en dehors des humeurs de l'organisme, c'est-à-dire dans les tissus ? Une première réponse a été donnée à cette question par C. Levaditi et S. Nicolau (1), en 1922. Ces auteurs, répétant avec le neurovaccin leurs expériences sur l'encéphalite épidémique, ont démontré que le cerveau des lapins immuns est capable de neutraliser *in vitro* le virus vaccinal. Ces travaux amorçaient l'étude de la répartition des anticorps dans les tissus. Il nous a semblé intéressant de reprendre cette étude d'une façon systématique (2).

Au moment où nos expériences étaient presque terminées, Mac Master et Kidd (3) publiaient les conclusions de leurs travaux sur l'origine des anticorps dans la vaccine. Ils ont retrouvé ceux-ci avec régularité dans les ganglions lymphatiques et la rate des animaux récemment immunisés.

Nous avons réalisé nos expériences avec une méthode différente de celle des auteurs américains. Nous avons utilisé des lapins immunisés depuis plusieurs mois. Ces animaux étaient inoculés avec le neurovaccin par voie intradermique et éprouvés par voie intracérébrale. Nous les avons sacrifiés par saignée totale. Les organes étaient prélevés aussitôt après la mort de l'animal, puis émulsionnés dans l'eau physiologique à des taux constants. La neutralisation était faite selon la méthode habituelle : le mélange du virus et du sérum ou des organes séjournait à l'étuve à 37°, puis à la glacière jusqu'au moment de l'inoculation. Ces mélanges étaient inoculés au lapin, par voie intradermique, afin de déterminer leur virulence. Nous avons répété plusieurs fois l'expérience et obtenu des résultats concordants :

Le sérum des animaux immuns s'est montré actif dans tous les cas.

(1) C. LEVADITI et S. NICOLAU. *C. R. Soc. Biol.*, **86**, 1922, p. 233.

(2) J. VIEUCHANGE. *Bull. Acad. Méd.*, **118**, 1937, p. 372.

(3) P. O. Mc MASTER et J. G. KIDD. *Journ. Exp. Med.*, **66**, n° 1, 1937, p. 73.

D'autre part, certains organes ont manifesté un pouvoir neutralisant, à un degré plus ou moins élevé :

La *rate* s'est montrée constamment douée de propriétés neutralisantes.

Avec les *ganglions lymphatiques*, nous avons obtenu une neutralisation complète dans la moitié des cas et, dans l'autre moitié, une neutralisation partielle.

Le *cerveau* a présenté un pouvoir sensiblement égal en intensité à celui des ganglions lymphatiques.

Avec la *moelle osseuse*, l'effet d'atténuation était évident, mais à un moindre degré.

Les autres organes examinés, *foie*, *surrénale*, *testicule* se sont révélés dépourvus de tout pouvoir neutralisant *in vitro*.

SUR L'UNION DES ANTICORPS NEUTRALISANTS ET DU VIRUS VACCINAL

par J. VIEUCHANGE.

L'union des anticorps neutralisants et du virus vaccinal a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Nos expériences ont consisté à comparer systématiquement le pouvoir respectif de différents facteurs de dissociation des mélanges neutres.

D'une part, nous avons recherché l'influence des voies d'inoculation sur la virulence des mélanges de virus vaccinal et d'antisérum. D'autre part, en collaboration avec L. Stamatin et I. Mesrobianu, nous avons étudié l'action exercée sur ces mélanges par certains milieux de culture *in vitro*.

Nous avons fait les constatations suivantes :

1° Des mélanges de virus vaccinal et d'immunsérum parfaitement neutres pour la peau, recouvrent plus ou moins leur virulence lorsqu'on les ensemence *in vitro* soit dans des milieux de culture contenant des cellules embryonnaires (1), selon la méthode de Rivers, soit sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet (2).

2° Lorsque ces mélanges sont injectés *in vivo*, en utilisant des voies d'inoculation différentes, ils peuvent recouvrer toute leur virulence (3). C'est ainsi que le cerveau, la cornée, le testicule du lapin se comportent comme des facteurs de dissociation très actifs.

Le classement par ordre décroissant des divers facteurs de dis-

(1) J. VIEUCHANGE et L. STAMATIN. *C. R. Soc. Biol.*, **128**, 1938, p. 904.

(2) J. VIEUCHANGE et I. MESROBIANU. *C. R. Soc. Biol.*, **128**, 1938, p. 951.

(3) J. VIEUCHANGE. *C. R. Soc. Biol.*, **128**, 1938, p. 953.

sociation des mélanges virus-vaccinal-immunsérum peut s'établir ainsi : testicule, cornée, cerveau, membrane chorio-allantoïde, milieux de culture à base de cellules embryonnaires.

Sans doute cette classification est-elle incomplète, mais elle souligne le rôle important joué par les tissus dans la réponse à l'injection des mélanges de virus et d'immunsérum. La neutralité ou la virulence de ceux-ci est donc une notion relative. Elle ne peut s'apprécier qu'en fonction du tissu dans lequel le mélange est inoculé. Précisons qu'en employant les mots « union » et « dissociation », nous nous sommes servi d'une terminologie courante qui ne préjuge en rien le mécanisme véritable du phénomène de neutralisation.

ULTRAFILTRATION DU VIRUS DE LA VACCINE CULTIVÉ *IN VITRO*

par LUDMILLA STAMATIN.

La première ultrafiltration du virus neurovaccinal a été réalisée en 1923 par Levaditi et Nicolau (1) [sacs en collodion]. Plus tard, Bechhold et Schlesinger (2) ont fait les premiers essais pour déterminer les dimensions probables de l'unité virulente de ce virus. Mais ce sont surtout Elford et Andrewes (3) qui ont étudié ce problème en détail, par le procédé d'Elford (4) [membranes en collodion à pores de diamètre calculé au préalable]. D'après ces auteurs, la taille du virus vaccinal (neurovaccine de Levaditi et Nicolau) est entre 0,125 μ et 0,175 μ ; la virulence du liquide soumis à la filtration influence la détermination du point terminal de la filtrabilité. Ces résultats sont ultérieurement confirmés par Levaditi, Païc et Krassnoff (5).

Nous nous sommes demandé si le virus neurovaccinal, cultivé *in vitro*, se comporte de la même manière que le virus cultivé dans le cerveau ou le testicule du lapin, à l'égard des membranes en collodion.

Pour nos expériences, nous nous sommes servi de la neurovaccine de Levaditi et Nicolau (6), cultivée *in vitro* dans un milieu composé d'une suspension de cellules embryonnaires de poulet en voie de survivance dans le liquide Tyrode.

(1) LEVADITI et NICOLAU. *C. R. Ac. Sc.*, **176**, 1923, p. 717.

(2) BECHHOLD et SCHLESINGER. *Biochem. Zeitschr.*, **236**, 1935, p. 387.

(3) ELFORD et ANDREWES. *Brit. Journ. of exp. Path.*, **13**, 1932, p. 36.

(4) ELFORD. *Journ. of Path.*, **34**, 1931, p. 505.

(5) LEVADITI PAÏC et KRASSNOFF. *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 526.

(6) LEVADITI et NICOLAU. *Ann. Inst. Pasteur*, **37**, 1923, p. 1.

Des cultures âgées de trois jours sont débarrassées des cellules par une centrifugation à 4.800 t. m. pendant cinq minutes. Le liquide surnageant, limpide, très peu opalescent, est soumis à des ultrafiltrations selon la technique d'Elford.

Trois séries d'expériences semblables ont été réalisées, et, pour chaque expérience, les cultures de virus se trouvaient, respectivement, à leurs sixième, neuvième et douzième passages. L'ultrafiltration a été effectuée à travers 5 membranes, dont le diamètre moyen des pores était de 0,96, 0,65, 0,39, 0,32 et 0,19 μ , respectivement. La virulence de chaque filtrat a été titrée par voie intradermique sur deux lapins. Les trois expériences ont donné des résultats identiques.

Voici les données d'une de ces expériences :

Liquide témoin (culture centrifugée à 4.800 t. m., pendant cinq minutes) : *actif* jusqu'au 1/100.000.

Liquide filtré sur la membrane de 0,96 μ : *actif* jusqu'au 1/10.

Les liquides filtrés sur les membranes de 0,65, 0,39, 0,32 et 0,19 μ n'ont donné aucune réaction.

Quatorze jours plus tard, tous les lapins-test ont été réinoculés, par *voie intracérébrale* avec du neurovaccin (émulsion de cerveau virulent). Ces animaux sont morts les quatrième et cinquième jours, sauf un lapin inoculé avec le liquide filtré sur la membrane de 0,65 μ (le deuxième lapin est mort le sixième jour), et tous les lapins qui avaient été inoculés avec le liquide témoin et le liquide filtré sur la membrane de 0,96 μ .

CONCLUSIONS. — Si l'on compare les résultats enregistrés par Elford et Andrewes (taille 125 à 175 m. μ) et par Levaditi, Païc et Krassnoff (taille 140 à 160 m. μ) à nos résultats obtenus en ultrafiltrant, par la même méthode d'Elford, le virus vaccinal cultivé *in vitro* (taille 490 à 650 m. μ), il devient évident que les données fournies par l'ultrafiltration peuvent varier sensiblement suivant le milieu dans lequel les unités virulentes sont incorporées.

SUR LA DÉTERMINATION DE LA CONSTANTE DE SÉDIMENTATION DE L'HÉMOLYSINE

par M. PAÏC.

Une particule soumise à l'influence d'une force centrifuge se déplace, dans le sens de cette force, avec une certaine vitesse. La vitesse que la particule prend pour une force de 1 dyne est nommée *constante de sédimentation*. Elle est d'habitude ramenée par le calcul à la vitesse que la particule aurait en sédimentant

dans l'eau pure à 20° C (Svedberg). La constante de sédimentation ainsi définie est principalement une fonction de la densité, de la taille et de la forme de la particule. Elle permet, à elle seule, de fixer l'ordre de grandeur du poids moléculaire du corps ultracentrifugé. En liaison avec la constante de diffusion, elle permet la détermination exacte du poids moléculaire (Svedberg). La constante de sédimentation est en général d'autant plus grande que le poids moléculaire est plus élevé.

J'ai montré récemment que l'on peut déterminer la constante de sédimentation, d'une manière extrêmement simple, à l'aide d'ultracentrifugeuses qui ne permettent pas l'observation du cheminement des particules pendant la centrifugation. On centrifuge le corps *A*, dont on cherche la constante de sédimentation *s*, en présence d'un corps *A'*, dont on connaît la constante de sédimentation *s'*. On a alors :

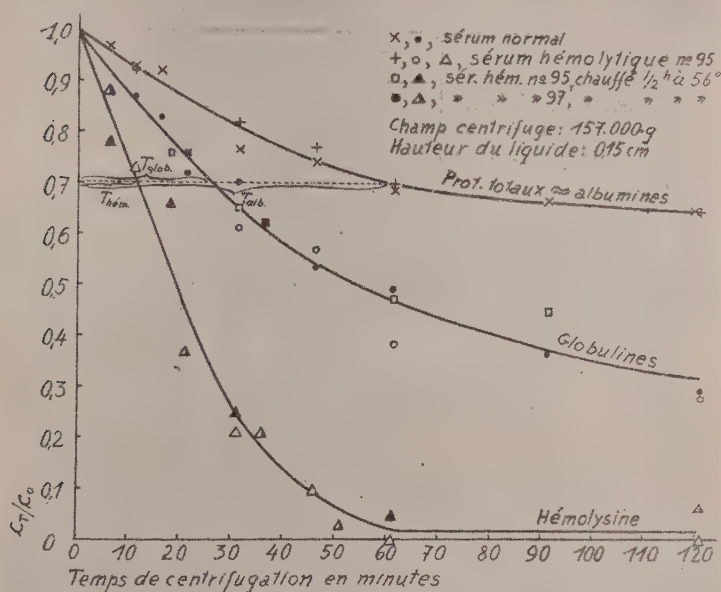
$$s = s' \frac{T'}{T} \varphi,$$

où *T* et *T'* sont les temps de centrifugation pour lesquels, dans le liquide surnageant, après centrifugation, les concentrations relatives du corps *A* et du corps *A'* sont les mêmes. Ces concentrations relatives sont exprimées par le rapport $C_T : C_0$, où C_0 est la concentration initiale d'un composant et C_T sa concentration dans le liquide surnageant après le temps *T*. φ est un facteur de correction qui, dans le cas où les corps *A* et *A'* ont la même densité, est égal à l'unité.

La relation citée permet de déterminer la constante de sédimentation d'un corps sans que l'on connaisse le rayon de la centrifugeuse, la forme et les dimensions des coupelles de centrifugation et la vitesse absolue de rotation. Elle reste en particulier valable si l'ultracentrifugeuse n'est pas absolument stable et si une partie du dépôt passe dans le liquide surnageant au moment de l'arrêt. Cette relation peut être utilisée pour la détermination de la constante de sédimentation des ultravirus et des bactériophages. Je l'ai, pour le moment, appliquée à l'établissement de la constante de sédimentation de l'hémolysine spécifique de lapin anti-mouton, dont la sédimentation dans le champ centrifuge a été reconnue, simultanément et indépendamment, d'une part par Gratia et Goreczki et, d'autre part, par M^{me} Chorokhoff et moi-même. L'ultracentrifugeuse que j'ai employée a été celle de Henriot et Huguenard. Le sérum a été mis dans une coupelle conique en platine dont la périphérie a été garnie de papier-filtre, qui empêche la dispersion du dépôt au moment de l'arrêt de la centrifugeuse. La sédimentation de l'hémolysine a été comparée à celle des albumines et des globulines sériques, dont les constantes de sédimentation sont connues.

Les courbes de sédimentation obtenues sont reproduites sur le

graphique. Elles représentent la diminution de la concentration relative des composants du sérum en fonction du temps de centrifugation pour une vitesse de rotation donnée. Elles correspondent à plusieurs sérums hémolytiques, inactivés ou non, et à un sérum normal. On voit, d'une part, que l'inactivation n'influence ni la sédimentation de l'hémolysine ni celle des globulines et que les albumines et les globulines du sérum normal



sédimentent comme celles des sérums hémolytiques. D'autre part, on remarque que les courbes sont anormales pour les temps de centrifugation supérieurs à quarante minutes. La sédimentation devient alors fortement ralentie. Ce ralentissement est très vraisemblablement dû à l'augmentation considérable de la viscosité et de la concentration dans les couches périphériques du sérum, pendant l'ultracentrifugation ou à une protection insuffisante du papier-filtre. Des parties normales des courbes on déduit pour le rapport $T_{glob} : T_{hém} = 2,3$ et pour $T_h : T_{hém} = 4,6$. En introduisant ces rapports et les constantes de sédimentation correspondantes des globulines ($s_{glob} = 7,1.10^{-13}$) et des albumines

($s_{\text{alt}} = 4,5 \cdot 10^{-13}$) dans l'équation citée et en supposant que le facteur φ est égal à l'unité, on obtient pour la constante de sédimentation de l'hémolysine les valeurs $16,3 \cdot 10^{-13}$ et $21 \cdot 10^{-13}$, en moyenne $18,9 \cdot 10^{-13}$ cm. sec. $^{-1}$ dynes $^{-1}$. Nous voyons que la valeur obtenue est supérieure à celle des albumines et à celle des globulines. Le poids moléculaire de l'hémolysine est donc certainement de beaucoup supérieur à celui des globulines. Il est vraisemblablement de l'ordre du million. L'hémolysine n'est donc pas identique aux globulines, ou, plus exactement, à la fraction principale des globulines. La constante de sédimentation de l'hémolysine est très voisine de celle trouvée, à l'aide d'ultracentrifugeuses à système d'observation, par l'école de Wyckoff et de Svedberg, pour l'anticorps antipneumococcique de certains animaux. Elle correspond assez exactement à celle des protéides lourds que l'on rencontre parfois dans le sérum de mammifères.

M. Grabar. — Dans ses expériences sur l'ultracentrifugation des constituants du sérum sanguin, McFarlane a constaté des variations dans les vitesses de sédimentation des divers composants protéiques du sérum lorsque l'on centrifuge un mélange de ces protéides. Je me demande si, dans la technique employée par M. Païc, un tel phénomène n'a pas lieu.

M. Païc. — Dans les expériences de McFarlane il ne s'agit pas d'une variation de la vitesse de sédimentation des divers composants d'un sérum, mais d'un désaccord entre la *quantité* de composants déterminée par voie chimique ou synthétique et par ultracentrifugation. D'après Pedersen, il s'agit d'un phénomène d'association ou de dissociation moléculaire. Chaque composant, qu'il soit préexistant ou formé par interaction chimique, garde néanmoins sa constante de sédimentation individuelle et caractéristique. Le phénomène de McFarlane, s'il a lieu, n'empêche donc aucunement l'emploi de notre relation, dans laquelle les concentrations absolues des composants n'interviennent pas.

LE VIRUS Y SUR LES POMMES DE TERRE

par J. DUFRÉNOY.

Le virus Y, inoculé par les pucerons *Myzus persicæ* à des pommes de terre exemptes de virus, provoque des modifications des cellules périvasculaires des nervures des feuilles : les chloroplastes se vésiculent ou se gonflent, s'agglutinent et brunissent ; la solution vacuolaire s'enrichit en cristaux octaédriques d'oxalate de calcium ; la cellule se plasmolyse et se contracte, tandis que

son contenu devient brun. La localisation des nécroses au voisinage des nervures vaut à la maladie son nom anglais de « streak », français de « bigarrure ».

Les feuilles affectées se séparent de la tige par rupture de la base du pétiole, ne restant attachées à la tige que par quelques fibres.

Cette chute de feuilles s'observe dans diverses maladies causées par des virus provoquant l'apparition de lésions nécrotiques ; par exemple le piment, *Capsicum frutescens*, localise définitivement le virus de la mosaïque du tabac à la feuille inoculée, puisque celle-ci tombe peu après l'apparition des nécroses autour des points d'inoculation.

La chute des feuilles affectées ne paraît pas préserver la pomme de terre dans le reste de son appareil foliaire, ni dans ses tubercules, contre la généralisation du virus.

Des pommes de terre de variété Up to Date, exemptes de virus et importées d'Irlande, plantées dans différentes stations des Pyrénées au voisinage de cultures de pommes de terre locales, sont contaminées, pour la plupart, par des *Myzus persicæ* et montrent les nécroses périvasculaires dues au virus Y, dès le mois d'août. Isolées, à distance de champs de pommes de terre du pays, elles demeurent saines (à de rares exceptions près, la contamination par quelques rares pucerons pouvant s'observer à plusieurs centaines de mètres de distance). Dans un champ isolé de la commune de Cazaux-Fréchet, les pommes de terre Up to Date ont produit par pied 1.018 ± 280 grammes de tubercules ; dans des champs où elles étaient exposées à la contamination par virus Y des communes voisines de la vallée d'Aure, elles ont produit 577 ± 140 grammes.

Le tableau suivant résume les poids moyens de tubercules par plante de pomme de terre saine importée d'Irlande (Up to Date ou Arran Banner) en station isolée (C. F.), ou exposée à la contamination au voisinage de pommes de terre du pays (A, E, S), et comparativement les poids moyens par plante de pomme de terre « du pays ».

	C. F.	E	S	A	MOYENNE par variété
Up to date	1.018	825	577	615	756
Arran Banner.	673	554	489	436	538
Pays	745	715	715	646	705
Moyenne par station . . .	812	594	698	566	667,3

La signification de l'excès de rendement d'Up to Date préservé de contamination à Cazaux-Fréchet par rapport à la moyenne

générale $1.018 - 667,3 = 350,7$, ressort du calcul de la déviation standard imputable aux « erreurs d'expérience », $\sigma^{\circ} = 81$, par la méthode d'« analyse de la variance » :

ORIGINE DE LA VARIATION	DEGRÉS de liberté	SOMME des carrés	VARIANCE	DÉVIATION standard
Entre variétés	2	780,00		
Entre stations	3	1 504,00	50,400	
Erreur, par différence	6	393,00	6,500	$\sigma_r = 81$
Total	11	2 677,00	22,520	$\sigma_t = 150$

Pratiquement, trois techniques peuvent être envisagées pour lutter contre la diminution de rendement par maladies à virus : 1° se procurer des tubercules de plantes exemptes de virus, provenant de pays où se pratique une sélection efficace ; 2° produire des plantes exemptes de virus, par semis de graines et culture de plantules à l'abri de toute contamination sous cage ou en station isolée ; maintenir les produits successifs de la culture de ces plantes saines à l'abri de toute contamination ; 3° se résigner à ne cultiver, dans les régions où la contamination est inévitable, que des plantes tolérant les virus, appartenant à des variétés dites « résistantes ».

SUR LA NATURE DE CERTAINES ÉMULSIONS DE TISSUS EMPLOYÉES COMME VACCINS CONTRE LES MALADIES A VIRUS FILTRABLES

par H. JACOTOT.

(*Institut Pasteur de Nha-Trang, Annam.*)

S'il est indiscutable que certaines émulsions de tissus doivent leur pouvoir de vacciner à ce que le virus qu'elles contiennent, modifié — qualitativement ou quantitativement — mais sûrement vivant a gardé l'aptitude à se multiplier dans l'organisme (vaccin de Pasteur contre la rage, vaccin de Laigret contre la fièvre jaune, virus chimiquement affaiblis contre la peste du cheval, la fièvre aphteuse, la peste porcine), il y a désaccord sur la nature, vivante ou morte, d'un grand nombre d'émulsions vaccinales qui, en raison du traitement qu'elles ont subi, ont perdu leur pouvoir pathogène à l'égard des animaux les plus sensibles au virus con-

sidéré ; c'est le cas de la plupart des vaccins formolés et de plusieurs vaccins glycinés, phéniqués, toluénés, chloroformés, etc.

Plusieurs auteurs, se référant au fait qu'il existe du virus vivant dans certains vaccins dépourvus d'action pathogène, déniaient tout pouvoir vaccinant aux émulsions mortes.

L'emploi de la cataphorèse a permis d'établir, effectivement, que dans des pulpes organiques formolées que l'on croyait dépourvues de toute virulence, il subsistait encore du virus vivant. D'autre part, P. Lépine et M^{lle} Sauter ont montré que certains vaccins antirabiques phéniqués inoculés au lapin par voie cérébrale demeurent capables de déterminer les lésions nucléaires de la rage à virus fixe, alors même qu'ils ont perdu leur pouvoir pathogène pour le lapin.

Mais un grand nombre de bactériologistes restent néanmoins convaincus que certaines émulsions organiques hautement vaccinnantes ne contiennent pas trace de virus vivant ; l'étude des vaccins formolés fournit à cet égard des arguments dont l'intérêt n'est pas contestable encore qu'ils ne possèdent pas une valeur absolue. Contrairement à certains agents chimiques plus modérés dans leurs effets, le formol détruit rapidement, même à petites doses, tous les inframicrobes ; or, c'est fréquemment au taux de 5 à 7 p. 1.000 qu'on formolise les émulsions de pulpes organiques.

Les émulsions formolées les plus actives et les plus constantes dans leurs effets sont les émulsions les plus fines, celles où les parenchymes chargés d'inframicrobes ont subi le plus sûrement l'action du formol.

Certains des organes utilisés pour la préparation des vaccins formolés contre les pestes animales contiennent un grand nombre de germes figurés, sporulés ou non ; or, moins de vingt-quatre heures après la préparation des émulsions, ni les inoculations, ni les ensemencements ne permettent d'y déceler un seul germe vivant ; on comprendrait mal que les inframicrobes, beaucoup plus vulnérables, échappent pendant des semaines à l'action bactéricide du formol.

Enfin, tandis que les pestes animales engendrent une immunité absolue et définitive, les émulsions organiques formolées ne confèrent qu'une résistance partielle qui s'affaiblit progressivement.

Il serait très désirable qu'à la faveur de nouvelles acquisitions on parvint à trancher la question. Indépendamment de l'intérêt qu'elle présente du seul point de vue de l'immunologie théorique, il serait utile que fût connue la nature, vivante ou morte, des divers vaccins employés contre les maladies à virus filtrables car, en dépit de leur commune innocuité et de la similitude de leurs effets immédiats, de tels vaccins, selon qu'ils sont vivants ou morts, ne sauraient être considérés comme offrant une égale sécurité d'emploi, ni comme susceptibles d'engendrer la même résistance à la maladie

ÉTUDE SUR QUATRE SOUCHES DE VIRUS DES RUES ISOLÉES DE CAS OU LE TRAITEMENT ANTIRABIQUE AVAIT ÉCHOUÉ

par DÉMÈTRE JONNESCO.

Il y a un certain parallélisme entre l'agressivité d'une souche de virus rabique des rues et la rapidité de sa fixation au cours des passages dans le cerveau de lapins. Ainsi, le virus de l'Ouloufato, qui se transmet rarement chez l'homme dans la nature, avait été réputé « immuable » avant les travaux de S. Nicolau, C. Mathis et V. Constantinesco. Par contre, nous avons constaté que les virus qui engendrent la rage chez l'homme, malgré le traitement préventif au virus-vaccin, sont des virus se fixant très vite sur lapins et dont l'incubation de la variante fixée est très courte. Nous avons étudié quatre de ces derniers virus, provenant de quatre individus morts de rage ; dans tous ces cas, la vaccination antirabique s'était avérée inefficace.

Les quatre souches de virus isolées à partir de ces cas, se ressemblent : elles présentent d'emblée des caractères de virus renforcés, se fixent très vite sur l'encéphale du lapin, sont très pathogènes par inoculation sous-cutanée chez la souris et titrent en moyenne 1/500.000 ; cependant, elles sont neutralisées *in vitro* par le sérum antirabique, comme toutes les autres souches de rage.

Il est à remarquer que l'incubation de la maladie produite par les virus fixes obtenus à partir des quatre virus des rues ayant déterminé la rage chez l'homme malgré le traitement, a été remarquablement courte ; dans les quatre cas elle s'est fixée à trois jours.

L'existence, dans la nature, de virus possédant une adaptation naturelle renforcée pour le névraxe, explique, en partie au moins, certains insuccès du traitement antirabique.

SIXIÈME SÉANCE

ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

Le samedi 29 octobre, dernier jour du Congrès, l'Association des Microbiologistes de langue française a tenu son Assemblée générale statutaire.

Après approbation du compte rendu financier, présenté par le trésorier, et du compte rendu de l'activité de l'Association par le secrétaire général, l'Assemblée a pris, entre autres, les décisions suivantes, qui sont portées à la connaissance des membres de l'Association :

1° *Commission de Présentation.*

L'Assemblée ratifie la composition de la Commission de Présentation qui comprend, outre le président et le secrétaire général, membres de droit, 10 membres élus. L'Assemblée désigne MM. Blanc, Boivin, J. Bordet, Ciuca, Courmont, Lemierre, Lwoff, Nègre, Reh et Sergent. Elle procède ensuite, par tirage au sort, à la désignation de 5 membres dont les fonctions expireront en 1939. MM. Lemierre, Ciuca, Nègre, Courmont et Sergent sont ainsi choisis. L'Assemblée désigne pour les remplacer MM. Brumpt, Boquet, Balteanu, Lisbonne et Burnet, dont les fonctions débiteront en 1939 et se termineront en 1941. Les 5 autres membres de la Commission qui n'ont pas été désignés par le tirage au sort resteront en fonctions jusqu'en 1940 et seront remplacés à cette date par l'Assemblée générale.

Les statuts sont modifiés par l'adjonction d'un article 4 *bis*, ainsi conçu : « La Commission de Présentation se réunit au moins une fois l'an, et plus souvent si elle le juge nécessaire. Elle est autorisée à admettre d'emblée dans l'Association, sous réserve de ratification ultérieure par l'Assemblée générale, les candidats qui auront reçu l'agrément unanime des membres de la Commission de Présentation ».

2° *Congrès de 1940.*

Il n'y aura pas de Congrès de l'Association en 1939, en raison du Congrès international de l'Association internationale de Microbiologie, à laquelle est rattachée l'Association des Microbiologistes de langue française, Congrès qui aura lieu en septembre, à New-York.

L'Assemblée décide que son prochain Congrès aura lieu à Bruxelles pendant la dernière semaine du mois de septembre 1940.

Les sujets suivants ont été choisis pour être étudiés au Congrès de 1940 :

1^{er} rapport : « Rickettsia », rapporteur : M. Etienne Burnet.

2^e rapport : « Acquisitions nouvelles dans l'étude des Spirochètoses », rapporteur : M. Bessemans.

3^e rapport : « Notion d'espèce en Bactériologie. Etude de la variabilité microbienne », rapporteur : M. Prévot.

Les communications de bactériologie générale seront traitées dans la séance qui fera suite au 3^e rapport. En outre, deux séances spéciales seront consacrées l'une aux communications sur *les ultravirus*, l'autre à *la microbiologie des maladies coloniales*.

3^e Bureau de l'Association.

Le Bureau de l'Association est ainsi constitué jusqu'au Congrès de 1940 :

Présidents d'honneur : M. E. Leclainche, M. S. Winogradsky.

Président : M. Louis Martin.

Vice-Président : M. Jules Bordet.

Secrétaire général : M. Pierre Lépine.

Trésorier : M. A.-R. Prévot.

Les membres de l'Association sont invités à faire parvenir au trésorier (compte chèques postaux n° 409.66) leur cotisation pour l'année 1938-1939.

Le secrétaire général :
P. LÉPINE.

TABLE DES AUTEURS

RAPPORTS.

Boivin (A.) et Mesrobeanu	756
Bordet (P.)	782
Lwoff (A.)	777
Mesrobeanu (L.) et Boivin	756
Winogradsky (S.)	817

COMMUNICATIONS.

Ailoff (M.)	773
Armand (M ^{lle} Y.) et Kossovitch	834
Besredka (A.) et Gross	770
Bessemans (A.), v. Meirhæghe, v. Thielen, de Wilde, Wittebolle et de Borchgrave	813
Boquet (A.) et Sandor	761
Borchgrave (O. de), Bessemans, v. Meirhæghe, v. Thielen, de Wilde et Wittebolle	813
Bovet (D.), M. et M ^{me} Tréfouël et Nitti	811
Bovet (D.), M. et M ^{me} Tréfouël, Nitti et M ^{lle} Hamon	812
Chorine (V.)	829
Chorine (V.) et Lévy (Georgette)	775
Chorine (V.) et Marchoux	817
Comandon (J.) et de Fonbrune	842
Cotoni (L.) et Pochon	761
Dieryck (J.) et Machebœuf	766
Dufrénoy (J.)	876
Fonbrune (P. de) et Comandon	842
Fourneau (E.)	799
Friedheim (E.)	814
Grabar (P.)	764
Grasset (E.)	794
Gratia (A.)	845
Gross (L.) et Besredka	770
Gratia (A.) et Paillet	836,
Hamon (M ^{lle} V.), M. et M ^{me} Tréfouël, Nitti et Bovet	812
Jacotot (H.)	878
Jonnesco (D.)	880
Kossovitch (N.)	766
Kossovitch (N.) et Armand	834
Lacassagne (A.) et Wollman	864
Lagrange (E.) et Nélis	796

Lépine (P.), Mollaret et Sautter	868
Levaditi (C.).	853
Lévy (Georgette) et Chorine	775
Lévy-Bruhl et M ^{me} Ungar	828
Lisbonne (M.), Nègre, Seigneurin et Roman.	822
Lisbonne (M.), Roman et Renoux	823
Loiseau (G.) et Philippe.	790
Machebœuf (M.) et Dieryck	766
Maignon (F.).	818
Manil (P.).	858
Marchoux (E.) et Chorine	817
Meirhæge (A. Van), v. Thielen, de Wilde, Wittebolle, de Borchgrave et Bessemans.	813
Mercier (P.), Peyron et Poumeau-Delille	770
Métalnikov	824, 826
Meyer (Kurt)	769
Mollaret (P.), Sautter et Lépine	868
Nègre (L.), Seigneurin, Roman et Lisbonne	822
Nélis (P.) et Lagrange	796
Nicolau (S.).	860
Nitti (F.), Bovet et M. et M ^{me} Tréfouël	811
Nitti (F.), M. et M ^{me} Tréfouël, Bovet et Hamon	812
Païc (M.).	873
Paillot (A.) et Gratia	856, 857
Peyron (A.), Poumeau-Delille et Mercier	770
Philippe (M.).	792
Philippe (M.) et Loiseau.	790
Pochon (J.).	835
Pochon (J.) et Cotoni.	761
Poumeau-Delille, Mercier et Peyron.	770
Ramel (E.) et Vulliémotz.	820
Ramon (G.).	784, 787
Ramon (G.) et Richou	789
Reh (Th.).	838
Renaux (E.).	839
Renoux (G.), Lisbonne et Roman	823
Richou (R.) et Ramon	789
Robyn (G.).	836
Roman (G.), Lisbonne, Nègre et Seigneurin	822
Roman (G.), Renoux et Lisbonne.	823
Sandor (G.) et Boquet.	761
Sandor (G.) et Schæfer	763
Sautter (M ^{lle} V.), Lépine et Mollaret	868
Schæfer (W.) et Sandor.	763
Schæfer (W.) et Stamatin	772
Schœn (R.).	864
Schopfer (W.-H.).	779, 781
Seigneurin (R.).	831
Seigneurin (R.), Roman, Lisbonne et Nègre	822
Stamatin (M ^{me} L.).	872
Stamatin (N.) et Schæfer	772
Steinmann (J.).	841

Thielen (E. Van), de Wilde, Wittebolle, de Borchgrave, Bessemans et v. Meirhæghe.	813
Tréfouël (M. et M ^{me} J.), Nitti et Bovet	811
Tréfouël (M. et M ^{me} J.), Nitti, Bovet et Hamon	812
Ungar (M ^{me} G.) et Lévy-Bruhl	828
Vieuchange (J.)	870, 871
Vulliémox (C.) et Ramel.	820
Wilde (E. de), Wittebolle, de Borchgrave, Bessemans, v. Meirhæghe et v. Thielen	813
Wittebolle (P.), de Borchgrave, Bessemans, v. Meirhæghe, v. Thielen et de Wilde	813
Wollman (E.) et Lacassagne	864
Wollman (E.) et M ^{me} Wollman.	862
Zernoff (V.).	833

DISCUSSIONS.

Bertrand (G.)	777
Besredka (A.)	774
Boivin (A.)	758, 759, 760, 774, 832, 840
Bordet (J.)	759
Chodat (F.).	781
Choucroun (M ^{lle})	832
Darzens	834, 839
Dubreuil (G.)	797
Dujarric de la Rivière	779
Fourneau (E.)	810
Friedheim.	778
Gavrilov	830
Grasset (E.)	757, 783, 795
Hornus.	756
Lisbonne.	798, 832
Loghem (J.-J. Van)	758, 774
Loiseau.	782
Lwoff (A.)	777, 778, 779
Machebœuf	835
Maignon	770
Manil	853
Martin (L.)	783
Nélis.	783
Peyron.	770
Pittaluga	772
Renaux.	797, 835
Schopfer	777, 781, 810
Vandestrade (M.)	798
Weinberg	795
Wollman.	823, 852

TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 61

<i>Acido-résistants</i> . Action de l'huile de pin et de l'huile de Chaulmoogra sur les bacilles — —	172
<i>Agglutinines</i> . Action de substances non spécifiques sur le taux des anticorps. —	415
<i>Algérie</i> . Fièvre récurrente à <i>Spirochaeta hispanicum</i> en — . . .	217
<i>Allergie</i> et immunité produites par les bacilles morts émulsionnés dans des huiles végétales	355
— A propos de l'article de E. Coulaud sur « — et immunité produites par les bacilles morts émulsionnés dans des huiles végétales ».	579
<i>Amibiase</i> . Voir Amibe dysentérique.	
<i>Amibe dysentérique</i> . Rôle de la flore bactérienne, associée à l' — —, dans l'amibiase	5
<i>Animaux de laboratoire</i> . Voir Immunisation.	
<i>Anticorps</i> . Action de substances non spécifiques sur le taux des — (agglutinines)	415
<i>Antiendotoxique</i> . Chimiothérapie —	635
<i>Antigènes</i> somatiques et flagellaires des bactéries	426
<i>Antimalariques</i> . Renforcement de l'action thérapeutique des composés — de la série quinoléique	205
<i>Aviaire</i> . Caractères biologiques du bacille tuberculeux —	662
<i>Bacille aviaire</i> . Voir Aviaire.	
<i>Bacilles acido-résistants</i> . Action de l'huile de pin et de l'huile de Chaulmoogra sur les — — — et sur la tuberculose expérimentale du cobaye	172
<i>Pacilles de Stéfansky</i> . Cinq — — suffisent pour infecter le rat blanc.	296
— Moyen de reconnaître <i>in vitro</i> si le — — est mort ou vivant.	512
<i>Bacilles tuberculeux</i> . Caractères biologiques du — — aviaire. . . .	662
— Rôle de la centrifugation dans la recherche du bacille de Koch par les procédés d'homogénéisation	300
— Virulence des — — du type humain et du type bovin inoculés au lapin par voie méningée	479
— Variations de virulence pour le lapin de certaines souches de — — de type humain	109
— Lésions métastatiques produites par les — — morts enrobés dans les paraffines	121

<i>Bacilles tuberculeux morts</i> . Allergie et immunité produites par les — — émulsionnés dans des huiles végétales	355
Voir aussi <i>Allergie</i> .	
<i>Bacillus anthracis</i> . Immunisation des animaux de laboratoire et du mouton contre le charbon au moyen de souches non capsulogènes mais œdématogènes de — —	394
<i>Bacillus pullorum</i> et <i>B. gallinarum</i> . Souches américaines, asiatiques et européennes de —	536
<i>Bactéries</i> . Antigènes somatiques et flagellaires des —	426
— Etudes de systématique bactérienne	72
— Voir <i>Flore bactérienne</i> .	
<i>Bacterium megatherium</i> . Bactériophage du — —	33
<i>Blennorrhagie</i> . Séro-diagnostic différentiel de la syphilis, de la — et de la tuberculose	313
<i>Bore</i> . Répartition du — dans les organes du lis blanc	104
<i>Capsulogénèse</i> . Voir <i>Bacillus anthracis</i>	394
<i>Centrifugation</i> . Rôle de la — dans la recherche du bacille de Koch par les procédés d'homogénéisation	300
<i>Charbon</i> . Immunisation des animaux de laboratoire et du mouton contre le —	394
<i>Cheval</i> . Action du sérum de — normal sur la staphylotoxine.	54
<i>Chien</i> . Fièvre récurrente à <i>Spirochaeta hispanicum</i> en Algérie. Transmission par le rhipicéphale du —	217
<i>Chimiothérapie</i> antiendotoxique	635
— Phénomène de renforcement en —	205
<i>Chorioméningite</i> . Contamination de laboratoire avec le virus de la — lymphocytaire.	519
<i>Clostridium</i> . Etudes de systématique bactérienne	72
<i>Cobaye</i> . Action de l'huile de pin et de l'huile de Chaulmoogra sur la tuberculose expérimentale du —	172
<i>Commensaux</i> . Spirochètes — de l'homme.	255
<i>Congrès des Microbiologistes de langue française</i> , 756 et suiv.	
<i>Croissance</i> . Voir <i>Facteurs</i> .	
<i>Dysentérique</i> . Voir <i>Flore bactérienne</i> .	
<i>Endotoxique</i> . Chimiothérapie antiendotoxique.	635
<i>Facteurs de croissance</i> pour les micro-organismes.	580
— — et toxinogénèse	618
<i>Fièvre récurrente</i> à <i>Spirochaeta hispanicum</i> en Algérie.	217
<i>Flagellaires</i> . Antigènes somatiques et — des bactéries	426
<i>Floculation</i> . Sur la — en milieu tamponné de quelques sérums thérapeutiques	319
<i>Flore bactérienne</i> . Rôle de la — associée à l'amibe dysentérique, dans l'amibiase	5
<i>Homme</i> . Spirochètes commensaux de l'—	255
<i>Homogénéisation</i> . Rôle de la centrifugation dans la recherche du bacille de Koch par les procédés d'—	300
<i>Huile de Chaulmoogra</i> . Voir <i>Bacilles acido-résistants</i> .	

<i>Huile de pin.</i> Voir <i>Bacilles acido-résistants.</i>	
<i>Huiles végétales.</i> Allergie et immunité produites par les bacilles morts émulsionnés dans des — —	355
— Voir <i>Allergie.</i>	
<i>Immunisation des animaux de laboratoire et du mouton contre le charbon au moyen de souches non capsulogènes mais oedémato-gènes de Bacillus anthracis</i>	394
<i>Immunité.</i> Allergie et — produites par les bacilles morts émulsionnés dans des huiles végétales	355
— La scrofule, forme spéciale de la tuberculose avec des remarques sur l'— antituberculeuse	325
— Voir <i>Allergie.</i>	
<i>Incubation.</i> Durée d'— de la rage au Tonkin.	193
<i>Infection tuberculeuse spontanée chez les mammifères sauvages en captivité</i>	705
<i>Lapin.</i> Pouvoir rabicide dans le sérum sanguin de — vaccinés contre la rage	187
— Variations de virulence pour le — de certaines souches de bacilles tuberculeux de type humain	109
— Virulence des bacilles tuberculeux du type humain et du type bovin inoculés au — par voie méningée.	479
<i>Lis blanc.</i> Répartition du bore dans les organes du —	104
<i>Mammifères.</i> Infection tuberculeuse spontanée chez les — sauvages en captivité	705
<i>Méningite tuberculeuse.</i> Voir <i>Bacilles tuberculeux, Lapin.</i>	
<i>Microbiologistes.</i> Congrès des — de langue française, 756 et suiv.	
<i>Microbicide.</i> Action — des radiations ultra-violettes	565
<i>Milieu tamponné.</i> Flocculation en — — de quelques sérums thérapeutiques	319
<i>Moelles desséchées.</i> Voir <i>Rage.</i>	
<i>Mouton.</i> Immunisation des animaux de laboratoire et du — contre le charbon.	394
<i>Paraffines.</i> Lésions métastatiques produites par les bacilles tuberculeux morts enrobés dans les —	121
<i>Prémunition.</i> Voir <i>Fièvre récurrente.</i>	
<i>Pullorum-gallinarum.</i> Etude de souches américaines, asiatiques et européennes de microbes du groupe —	536
<i>Quinoléique.</i> Renforcement de l'action thérapeutique des composés antimalariques de la série —	205
<i>Radiations.</i> Action microbicide des — ultra-violettes.	565
<i>Rage.</i> Etude de 4 souches de virus des rues isolées de cas pour lesquels le traitement antirabique a échoué.	527
— Durée d'incubation de la — au Tonkin	193
— Etude expérimentale de la vaccination antirabique.	92
— Pouvoir rabicide du sérum sanguin de lapins vaccinés contre la —	187
<i>Rat blanc.</i> Voir <i>Bacilles de Stéfansky.</i>	

<i>Renforcement</i> . Phénomène de — en chimiothérapie. — de l'action thérapeutique des composés antimalariques de la série quinoléique	205
<i>Rhipicéphale</i> . Voir <i>Fièvre récurrente</i> .	
<i>Scrofule</i> , forme spéciale de la tuberculose avec des remarques sur l'immunité antituberculeuse	325
<i>Séro-diagnostic</i> différentiel de la syphilis, de la blennorrhagie et de la tuberculose.	313
<i>Sérum</i> . Extraits toxiques de streptocoques en —	45
— <i>de cheval</i> . Action du — — normal sur la staphylotoxine.	54
— <i>de convalescents</i> . Fièvre récurrente à <i>Spirochaeta hispanicum</i> en Algérie. Transmission par le rhipicéphale du chien. Prémunition	217
Pouvoir rabcide du — de lapins vaccinés contre la rage.	187
<i>Sérums thérapeutiques</i> . Sur la floculation en milieu tamponné de quelques — —	319
<i>Somatiques</i> . Antigènes — et flagellaires des bactéries.	426
<i>Souches</i> américaines, asiatiques et européennes de microbes du groupe <i>pullorum-gallinarum</i>	536
— Voir <i>Immunisation</i> , B <i>pullorum</i> .	
<i>Spirochaeta hispanicum</i> . Fièvre récurrente à — — en Algérie	217
<i>Spirochètes</i> commensaux de l'homme.	255
<i>Staphylotoxine</i> . Action du sérum de cheval normal sur la —	54
<i>Stéfansky</i> . Cinq bacilles de — suffisent pour infecter le rat blanc.	296
— Moyen de reconnaître <i>in vitro</i> si le bacille de — est mort ou vivant.	512
<i>Streptocoques</i> . Extraits toxiques de — en sérum animal	45
<i>Syphilis</i> . Séro-diagnostic différentiel de la —, de la blennorrhagie et de la tuberculose.	313
<i>Systématique bactérienne</i> . Etudes de — —. Critique de la conception actuelle du genre <i>Clostridium</i>	72
<i>Thérapeutique</i> . Renforcement de l'action — des composés antimalariques de la série quinoléique	205
<i>Toxines</i> . Facteurs de croissance et toxinogénèse	618
<i>Toxiques</i> . Extraits — de streptocoques en sérum animal.	45
<i>Tuberculose</i> . La scrofule, forme spéciale de la — avec des remarques sur l'immunité antituberculeuse	325
— Infection tuberculeuse spontanée chez les mammifères sauvages en captivité	705
— Lésions métastatiques produites par les bacilles tuberculeux morts enrobés dans les paraffines.	121
— Séro-diagnostic différentiel de la syphilis, de la blennorrhagie et de la —	313
— Sur la virulence des bacilles tuberculeux du type humain et du type bovin inoculés au lapin par voie méningée.	479
— Sur les caractères biologiques du bacille tuberculeux aviaire.	662

<i>Tuberculose</i> . Variations de virulence pour le lapin de certaines souches de bacilles tuberculeux de type humain.	109
— <i>expérimentale</i> . Action de l'huile de pin et de l'huile de Chaulmoogra sur les bacilles acido-résistants et sur la — — du cobaye.	172
<i>Ultra-violettes</i> . Action microbicide des radiations — —	565
<i>Vaccination antirabique</i> . Etude expérimentale	92
— — Pouvoir rabicide dans le sérum sanguin de lapins vaccinés contre la rage.	187
<i>Vaccin antirabique phéniqué</i> . Pouvoir rabicide dans le sérum sanguin de lapins vaccinés contre la rage comparativement par la méthode des moelles desséchées et au moyen du — —	187
<i>Virulence</i> des bacilles tuberculeux du type humain et du type bovin inoculés au lapin par voie méningée.	479
— Variations de — pour le lapin de certaines souches de bacilles tuberculeux de type humain	109
<i>Virus</i> . Voir <i>Chorioméningite lymphocytaire</i> .	
— <i>des rues</i> . Etude de quatre souches de — — isolées de cas pour lesquels le traitement antirabique a échoué.	527

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 61

BERTRAND (Gabriel) et SILBERSTEIN (Lazare). — Sur la répartition du bore dans les organes du lis blanc	104
BEUMER (J.). — L'action du sérum de cheval normal sur la staphylotoxine	54
BOIVIN (André). — Les antigènes somatiques et flagellaires des bactéries.	426
BOQUET (Alfred). — Recherches sur la virulence des bacilles tuberculeux du type humain et du type bovin, inoculés au lapin par voie méningée.	479
BORDET (Paul). — Facteurs de croissance et toxinogénèse.	618
BOUTARIC (Augustin) et M ^{me} ROY (Madeleine). — Sur la floculation en milieu tamponné de quelques sérums thérapeutiques.	319
BRÉTEY (J.). — Voir NÈGRE (L.).	
CHORINE (V.). — Voir MARCHOUX (E.).	
COLSON (M.). — Voir JACOTOT (H.).	
COTONI (L.) et POCHON (J.). — Etude des extraits toxiques de streptocoques en sérum animal	45
COULAUD (E.). — Allergie et immunité produites par les bacilles morts émulsionnés dans des huiles végétales.	355
CRUVEILHIER (L.), LÉPINE (P.) et VIALA (C.). — Pouvoir rabcide dans le sérum sanguin de lapins vaccinés contre la rage comparativement par la méthode des moelles desséchées et au moyen du vaccin phéniqué	187
DARZINS (E.). — Recherches sur l'action de l'huile de pin et de l'huile de Chaulmoogra sur les bacilles acido-résistants et sur la tuberculose expérimentale du cobaye	172
DAVY (P.-E.) et LEVADITI (Jean-C.). — Rôle de la centrifugation dans la recherche du bacille de Koch par les procédés d'homogénéisation	300
DELPY (L.) et RASTEGAR (R.). — Etude de souches américaines, asiatiques et européennes de microbes du groupe <i>pullorum-gallinarum</i>	536
DESCHIENS (R.). — Le rôle de la flore bactérienne, associée à l'amide dysentérique, dans l'amibiase.	5

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

893

DODERO (J.). — Sur la durée d'incubation de la rage au Tonkin. . .	193
GROSS (L.). — Voir BESREDKA (A.)	
HECHT (Hugo). — Séro-diagnostic différentiel de la syphilis, de la blennorrhagie et de la tuberculose.	313
JACOTOT (H.), COLSON (M.) et LE ROUX (G.). — Contribution à l'étude expérimentale de la vaccination antirabique	92
JONNESCO (Démètre). — Etude de quatre souches de virus des rues isolées de cas pour lesquels le traitement antirabique a échoué	527
KRITCHEVSKI (I.-L.). — Le phénomène de renforcement en chimiothérapie. Renforcement de l'action thérapeutique des composés antimalariques de la série quinoléique.... .	205
LÉPINE (P.). — Voir CRUVEILHIER (L.).	
— et M ^{lle} SAUTTER (V.). — Contamination de laboratoire avec le virus de la chorioméningite lymphocytaire	519
LE ROUX (G.). — Voir JACOTOT (H.).	
LEVADITI (C.) et VAISMAN (A.) (en collaboration avec REINIÉ (L.). — La chimiothérapie antiendotoxique	635
LEVADITI (Jean-C.). — Voir DAVY (P.-E.).	
LWOFF (André). — Les facteurs de croissance pour les microorganismes.	580
MARCHOUX (E.) et CHORINE (V.). — Cinq bacilles de Stéfansky suffisent pour infecter le rat blanc	296
MARFAN (A.-B.). — La scrofule, forme spéciale de la tuberculose avec des remarques sur l'immunité antituberculeuse	325
MESROBEANU (Lydia). — Voir BOIVIN (André).	
NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). — Sur les variations de virulence pour le lapin de certaines souches de bacilles tuberculeux de type humain.	109
POCHON (J.). — Voir COTONI (L.).	
PRÉVOT (A.-R.). — Etudes de systématique bactérienne. IV. Critique de la conception actuelle du genre <i>Clostridium</i>	72
PRUDHOMME (R.-O.). — Moyen de reconnaître <i>in vitro</i> si le bacille de Stéfansky est mort ou vivant	512
BASTEGAR (R.). — Voir DELPY (L.).	
REINIÉ (L.). — Voir LEVADITI (C.).	
RIST (Noël). — Les lésions métastatiques produites par les bacilles tuberculeux morts enrobés dans les paraffines	121
ROUYER (M.) et SERVIGNE (M.). — Etude de l'action microbicide des radiations ultra-violettes	565
ROY (M ^{me} Madeleine). — Voir BOUTARIC (Augustin).	
SAENZ (A.). — A propos de l'article de E. Coulaud sur « Allergie et immunité produites par les bacilles morts émulsionnés dans des huiles végétales ».	579
— Recherches sur les caractères biologiques du bacille tuberculeux aviaire	662
SAUTTER (M ^{lle} V.). — Voir LÉPINE (P.).	

- SEGUIN (P.) et VINZENT (R.). — Les spirochètes commensaux de de l'homme (premier mémoire) 255
- SERGENT (André) (*in memoriam*). — Fièvre récurrente à *Spirochaeta hispanicum* en Algérie. Transmission par le rhipicéphale du chien. Prémunition. Sérum de convalescents. 217
- SERVIGNE (M.). — Voir ROUYER (M.).
- SILBERSTEIN (Lazare). — Voir BERTRAND (Gabriel).
- STAMATIN (N.). — Immunisation des animaux de laboratoire et du mouton contre le charbon au moyen de souches non capsulogènes mais œdématogènes de *Bacillus anthracis*. 394
- URBAIN (Ach.). — L'infection tuberculeuse spontanée chez les mammifères sauvages en captivité. 705
- VAISMAN (A.). — Voir LEVADITI (C.).
- VIALA (C.). — Voir CRUVEILHIER (L.).
- VINZENT (R.). — Voir SEGUIN (P.).
- WAHL (Robert). — Action de substances non spécifiques sur le taux des anticorps (agglutinines) 415
- WOLLMAN (E.). — Etude sur le bactériophage du *B. megatherium* (à propos du mémoire de FLU (M.P.C.)). 33

Le Gérant : G. MASSON.